

На правах рукописи

Го Даньян

**АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ
ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ**

03.02.03- микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:	доктор биологических наук, доцент Юдина Татьяна Георгиевна
Научный консультант:	доктор биологических наук, профессор Баскова Изольда Парфирьевна
Официальные оппоненты:	Полянская Любовь Максимовна доктор биологических наук, профессор Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, кафедра биологии почв, ведущий научный сотрудник Ананьева Надежда Дмитриевна доктор биологических наук, Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие Государственный научно-исследовательский институт Генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Защита состоится 20 июня 2013 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Тел.8(495)939054-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ.

Автореферат разослан 20 мая 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы.

Многим белкам свойственна полифункциональность, то есть способность проявлять не одну, а две или более разных активностей, причем, с помощью различных механизмов. Лизоцимы полифункциональны, так как, помимо известных ферментативных активностей (мурамидазной и некоторых других), они способны и к неферментативному действию на клетки, включающему, прежде всего, связывание с цитоплазматической мембраной и нарушение её проницаемости, результатом чего является выраженный антимикробный эффект, проявляющийся и после потери их мурамидазной активности. Способность к мембранотропной активности лизоцимов и ряда других белков дали основание исследователям отнести их к группе антимикробных белков и пептидов (АМБП) – перспективной альтернативы антибиотикам для борьбы с возбудителями многих заболеваний. АМБП являются важной составляющей врождённого иммунитета (Wiesner, Vilcinkas, 2010).

Последние исследования показали сходство ряда АМБП с амилоидными белками, способными к образованию *in vivo* и *in vitro* агрегатов из фибрилл на основе перекрещивающихся β -слоёв (Torrent et al., 2010, 2012). Установлена способность с-лизоцима и других белков к формированию амилоидных фибрилл (Gharibyan et al., 2007; Harris et al., 2012). Многие исследователи сходятся во мнении, что амилоидогенность - общее свойство полипептидных цепей (Dobson, 1999; Bucciantini et al., 2002). Причём, образуемые различными белками агрегаты часто токсичны (Stefani, Dobson, 2003). Цитотоксичность амилоидов играет ключевую роль при возникновении многих заболеваний (например, болезней Альцгеймера, Паркинсона, амилоидозов, диабета 2 типа) и в то же время - в борьбе с патогенными микроорганизмами. Общим свойством амилоидов также является полиморфизм, в связи с множественностью путей образования фибрилл (Gharibyan et al., 2007). Поэтому исследование антимикробного действия полифункциональных АМБП представляет значительный теоретический и практический интерес.

Уникальный представитель полифункциональных белков, родоначальник семейства i-лизоцимов - Дестабилаза-Лизоцим (Д-Л) из секрета слюнных клеток медицинской пиявки, действие которого направлено на гидролиз бета-(1,4)-гликозидных связей между N-ацетил-мурамовой кислотой и N-ацетил-глюкозамином пептидогликана бактериальной стенки, обладающий также эндо- ϵ -(γ -Glu)-Lys-изопептидазной активностью. Д-Л способна к растворению стабилизированного фибрина и к расщеплению Д-димера (фрагмента деградации стабилизированного фибрина) до мономеров путем не протеолиза, а изопептидолиза эндо- ϵ -(γ -Глу)-Лиз связей, соединяющих мономеры, такой механизм приводит к медленному разрушению старых, преобразованных тромбов (Баскова и др., 2000, 2008, 2010, 2012; Завалова и др., 2010). Д-Л – высокоэффективный антимикробный агент благодаря своим ферментативной и мембранотропной активностям (Zavalova et al., 2006).

Изучение различных проявлений активности Д-Л имеет особую практическую значимость в связи с разработкой новых лекарственных средств, сочетающих тромболитические и антимикробные свойства.

Полифункциональны и Сгу-белки - основной компонент кристаллических параспоральных включений энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* - высокоспецифичные токсины некоторых насекомых и других беспозвоночных. Их молекулы могут по-разному проявлять свою

биологическую активность в зависимости от клеток - мишеней: 1) не только высокоспецифично разрушать клетки чувствительных беспозвоночных, связываясь с рецепторами на их мембранах и оказывая мембранотропное действие, 2) но и с меньшей специфичностью подавлять рост микроорганизмов посредством не изученного пока механизма, конечный эффект которого мембранотропный. Кристаллы ряда подвидов *B. thuringiensis* кроме Cry содержат и Cyt белки, которые также полифункциональны, так как проявляют, помимо неспецифичной инсектицидной активности, и антимикробную (Юдина и др., 1988; 1996; 2003; 2004, 2006, 2007).

Полифункциональность Cry и Cyt белков проявляется также в том, что они разрушают клеточную стенку микроорганизмов. Такой механизм отличается от мембранотропного и требует исследований. Имеются сообщения о влиянии белков кристаллов и на клетки млекопитающих.

Актуальность изучения антимикробной активности Cry-белков намного возросла в связи с введением *cry*-генов в растения для защиты последних от вредных насекомых. При этом большое количество таких белков, синтезируемых всеми частями генетически модифицированных растений, может накапливаться как в самих растениях, так и в почвах, и влиять на биоценозы. Особенно важны экологические последствия изменения почвенных микробиоценозов.

При попадании токсинов (например, белков параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis*) в насекомое у последнего возникает иммунный ответ, приводящий к синтезу лизоцимов, лизоцим-подобных и многих других белков. В этот период вышеуказанные токсины и лизоцимы могут взаимодействовать. Такие процессы представляют несомненный интерес для понимания экологической роли этих белков, их влияния на факторы врождённого иммунитета и на развитие инфекции. Принципиальные этапы этих процессов можно смоделировать *in vitro*, первым шагом при этом является изучение антимикробных эффектов Cyt, Cry белков, а также лизоцимов. Поэтому сравнительное изучение особенностей антимикробного действия полифункциональных белков из параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* и Д-Л из медицинской пиявки актуально, имеет большую теоретическую и практическую значимость.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение антимикробной активности и определение её экологической роли у различных полифункциональных белков: а) образующих параспоральные кристаллы энтомопатогенной бактерии *B. thuringiensis* и б) двух форм рекомбинантного белка Дестабилазы-Лизоцима. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Выделить белки параспоральных кристаллов *B. thuringiensis*, изучить антимикробный эффект прежде всего Cry1A белка на представителей царств грибов и бактерий, а также на архей.
- 2) Получить форму рД-Л, лишённую мурамидазной активности (рД-Л)_t, провести сравнительное исследование антимикробного эффекта этих белков на представителей царств грибов и бактерий.
- 3) Провести электронно-микроскопическое изучение морфологии лизирующихся микроорганизмов, чувствительных к антимикробной активности исследуемых белков, установить основные закономерности такого лизиса.
- 4) Исследовать с помощью ТЭМ морфологию фибрилл кристаллов *B. thuringiensis* и определить роль амилоидогенности белков кристаллов.
- 5) Подобрать различные инкубационные условия, которые бы дали возможность моделировать *in vitro* некоторые изменения антимикробной активности белков.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Белок рД-Л_t, лишённый мурамидазной активности, оказывает больший антибиотический эффект на грибы, чем нативный рД-Л.

2) На поверхности кристаллов *B. thuringiensis* обнаружены амилоидные фибриллы, их больше всего на поверхности кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *amagiensis*, состоящих из уникальных белков.

3) Прединкубация белков кристаллов с препаратом клеточных стенок и GalNAc активизирует образование амилоидных фибрилл этими белками, антибактериальная активность которых выше, чем у олигомеров.

4) Биогенные амины серотонин ослабляет антибиотическую активность белков кристаллов, а дофамин не оказывает на неё влияния.

Научная новизна и практическая значимость работы.

Сравнительное исследование антимикробной активности разных полифункциональных белков дало возможность проанализировать её экологическое и практическое значение. Впервые обнаружены амилоидные фибриллы на поверхности кристаллов *B. thuringiensis* и определено как их экологическое значение, так и их роль в проявлении антимикробной активности белков кристаллов. Впервые показано *in vivo*, что антимикробная активность Cry3A *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*, приводит к гибели значительного количества клостридий-симбионтов в средней кишке мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Эти клостридии чувствительны также к антибиотическому влиянию рД-Л и Cyt1A. Смоделирован *in vitro* анализ некоторых реакций иммунного ответа на цитотоксические полифункциональные АМБП. Изученное антимикробное действие полифункциональных белков имеет большое практическое значение для анализа последствий распространения генетически модифицированных растений, синтезирующих белки параспоральных кристаллов *B. thuringiensis*, а также для разработки нового лекарственного препарата на основе рД-Л, которая проходит в настоящее время.

Апробация работы и публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 3 научные статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Министерством Образования и ВАК РФ, а также 3 научные статьи в сборниках. Опубликовано 11 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2009), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, 2010), Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов» (Москва, 2010), Asian Congress on Biotechnology (Shanghai, 2011), VII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2011), Chinese Fourteenth National Conference on Environmental Microbiology (Xiamen, 2011), Съезде микробиологов Узбекистана (Ташкент, 2012), XIX и XX Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» и «Ломоносов-2013» (Москва, 2012, 2013), Международной конференции Ассоциации гирудологов (Харьков, 2012), II Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012), The 15th Guangzhou Convention of Oversea Chinese Scholars in Science and Technology (Guangzhou, 2012).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора

литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов. Работа изложена на 131 страницах, содержит 12 таблиц и 37 рисунков, приложения. Список литературы содержит 205 отечественных и зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы исследований.

В работе использовали типовые штаммы различных подвигов *Bt*, полученные из Института Пастера, хранящиеся на кафедре микробиологии МГУ. Использовали также штаммы, полученные и хранящиеся в ФГУП ВНИИ Генетика.

Параспоральные кристаллы получали после выращивания энтомопатогенных бактерий на жидких или агаризованных питательных средах, для получения белков отделяли кристаллы от спор по известной методике с помощью *n*-ксилола (Chestukhina et al., 1980). Смесь белков кристаллов *Bt* получали путём растворения отмытых кристаллов в 0,02н NaOH в течение 1 часа при перемешивании. Разделение белков кристаллов проводили с помощью жидкостной хроматографии посредством системы FPLC на колонке MonoQ ("Pharmacia", Швеция) разработанными методами (Chestukhina et al., 1980, 1986, 1994; Zalunin et al., 1982, 1998, 2004). Молекулярную массу белков и их фрагментов определяли электрофоретически в 10% ПААГ в присутствии 0,1% SDS. Полученные растворы, диализованные против 0,05М трис-HCl буфера pH 8,2 - 8,5, или 0,02 – 0,05М фосфатного буфера, pH 7,8 использовали для определения их антимикробной активности методом диффузии в агаре (Егоров и др., 1987, 1988; Юдина, Егоров, 1996).

В качестве тест-культур использовали микроорганизмы Музея кафедры микробиологии МГУ, а также полученные из коллекции DZMZ (Брауншвейг, ФРГ).

Тест-микроорганизмы выращивали на агаризованной среде №1(б), г/л: K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 2,0; цитрат натрия - 0,4; $MgSO_4$ - 0,05; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; 0,5% триптозного агара ("Reanal", Венгрия), H_2O дист.; pH 7,4.; а также на среде Чапека с 2% глюкозы, на картофельной, и на некоторых других средах (Нетрусов, 2005). Во всех случаях для приготовления агаризованных сред добавляли в них 13 г/л высокоочищенного агара производства фирм Difco (США) или Ferak (Германия).

Антибиотическую активность белков параспоральных кристаллов, а также рекомбинантного белка Дестабилазы–Лизоцима и некоторых его мутантов определяли, учитывая размер зоны подавления роста тест-культуры от конца лунки. Выражали удельную активность в единицах I/a (ед.), где I – ширина (не диаметр) четкой зоны подавления роста от края лунки (мм); a – количество белка, внесенного в лунку (мкг) (Yudina et al., 2003; Revina et al., 2005). Антибиотическую активность выражали и в ед/мг, используя при расчётах концентрацию раствора белка, внесённого в лунку, в мкг/мл (Юдина с соавт., 1992, 1996). Минимальные ингибирующие (или подавляющие) концентрации (МИК) растворов белков определяли известным способом путем учета антибиотических активностей ряда разведений. МИК выражали в мкг/мл раствора белка, внесенного в лунку. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами, достоверность различий $p < 0,05$. Изучение влияния препаратов КС и некоторых их компонентов, а также биогенных аминов, на проявление антибиотической активности белков кристаллов *B. thuringiensis* проводили так, как

описано ранее (Yudina et al., 2007, 2011).

При проведении опытов *in vivo* исследовали влияние Cry3A белка (он один образует параспоральные кристаллы использованного штамма *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, токсичного для личинок мучного хрущака *Tenebrio molitor*), на клостридий, обитающих в средней кишке этих личинок. Кормили личинок мукой с добавлением спор и кристаллов Cry3A белка, выделяли среднюю кишку в контроле и в опыте – после потери личинками подвижности и гибели под влиянием Cry3A белка. Количественно делали посеvy в жидкую среду для роста клостридий из этого гомогенизированного, прокипячённого материала и проводили подсчёт клеток, выросших из спор в анаэробных условиях. Также исследовали вид этих клеток в СЭМ и их чувствительность к антибиотическому действию Cry3A и рД-Л. Выделение колоний кристаллообразующих бацилл проводили на селективной среде с помощью метода ацетатной селекции (Нетрусов, 2005).

Изучение электронно-микроскопической картины влияния изучаемых белков на клетки микроорганизмов проводили после инкубации выращенных на агаризованной среде и отмытых клеток в 0,02М фосфатном или трис-HCl-буфере pH 7,8 – 8,2, соответственно, с 0,01% триптона или трипказина при 30⁰ С в течение 15 - 120 мин., а также выращенных на агаризованной среде и помещённых в стерильную воду клеток. При приготовлении препаратов для сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии (СЭМ и ТЭМ, в том числе, негативное контрастирование) использовали описанные способы. Контрастирование препаратов проводили с помощью 2% фосфовольфрамовой кислоты (Юдина, Богданов, 2005). Препараты изучали с помощью электронных микроскопов Jeol1011, JSM-6380 LA (Япония), Cam Scan (Великобритания) в Лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ. При работе с красителем Конго красным (Nilsson, 2004) использовали поляризационно-интерференционный световой микроскоп MPI-3 (Польша).

Исследовали антимикробное действие рекомбинантных Дестабилазы-Лизоцима (рД-Л) и некоторых мутантов этого белка, полученных в Институте Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и НИИ Физико-химической медицины ФМБА России. Для получения модифицированной формы рД-Л, лишённой мурамидазной активности (рД-Лt), этот белок прогревали на водяной бане при 90⁰С в течение 50 мин (Баскова и др., 2008, 2010).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование антимикробного действия двух форм рекомбинантной Дестабилазы-Лизоцима (рД-Л и рД-Лt), а также некоторых мутантов этого белка.

Полифункциональные белки лизоцимы обладают признаками АМБП (Torrent et al., 2009). Однако, антимикробное действие первого представителя i-семейства лизоцимов, дестабилазы-лизоцима из медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*, только начали изучать (Zavalova et al., 2006; Завалова и др., 2010). В составе белков этого семейства не выявлено НЛН последовательности (Baskova et al., 2000), характерной для представителей большинства других семейств лизоцимов, поэтому различные проявления активности полифункционального рД-Л могут иметь свои особенности.

Изучение антибиотического влияния двух форм рД-Л из медицинской пиявки на грибы.

Исследованные дрожжи *Candida guilliermondii*, *Shizosaccharomyces pombe* и мицелиальные

грибы *Botrytis cinerea* и *Verticillium lateriticum*. чувствительны к антимикробному действию рД-Л, и в ещё большей степени – к рД-Лт, что отчётливо наблюдается в световом микроскопе (рис. 1).

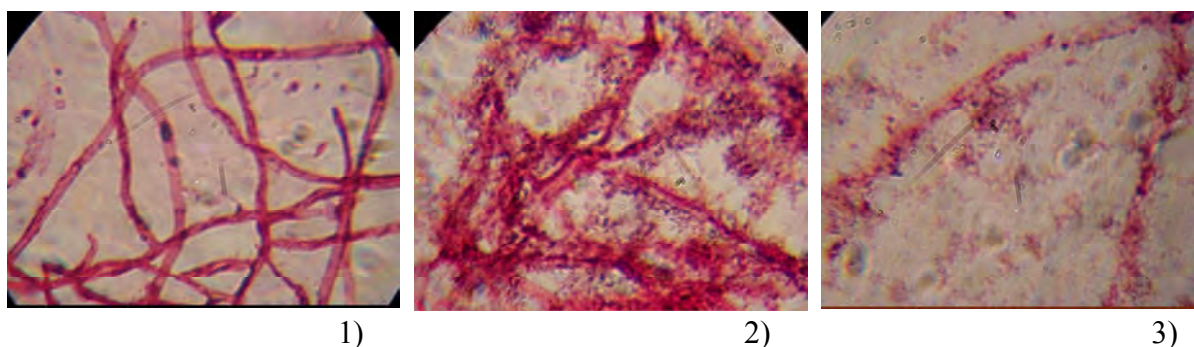


Рис. 1. Световая микроскопия клеток *Botrytis cinerea* после их инкубации при 30⁰ С в течение 3 ч с 20 мкг/мл рД-Л (2) или рД-Лт (3). Контроль (1). Условия опыта идентичны для обеих форм белка. Лизис гиф гриба под влиянием рД-Лт более интенсивный, чем под влиянием рД-Л.

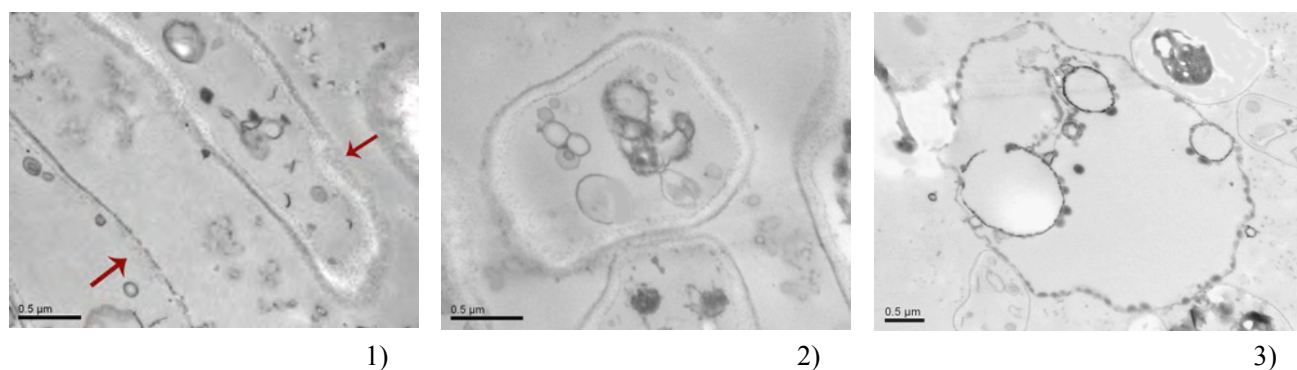


Рис.2. ТЭМ лизирующихся гиф *B.cinerea* после их инкубации при 30⁰ С в течение 3 ч с 20 мкг/мл рД-Лт: 1– разрушение участков клеточных стенок (указано стрелками); просветление цитоплазмы; образование кольцевых мембранных структур; 2 и 3 – поперечный срез мицелия, видно разрушение клеточных оболочек, образование кольцевых мембранных структур, лизис остатков клеток.

Картина лизиса гиф гриба *V. lateriticum* под влиянием рД-Л была сходной.

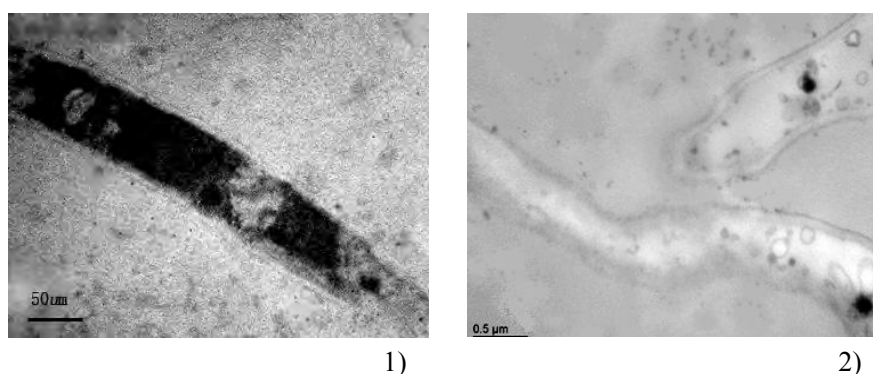


Рис. 3. ТЭМ лизирующих гиф *V. lateriticum* после их инкубации при 30⁰ С в течение 3 ч с 20 мкг/мл рД-Лт: слева – контроль, справа – лизирующие гифы (разрушение клеточных оболочек, образование кольцевых мембранных структур, лизис остатков клеток).

Жизнеспособность клеток различных исследуемых грибов утрачивалась через 5 - 8 часов после воздействия рД-Л, а после воздействия рД-Лт - через 3 - 5 часов, что также подтверждает более активное антибиотическое действие модифицированной формы белка. Активность рД-Л и рД-Лт, определённая методом диффузии в агар, составила 8 и 10 ед, в отношении *B. cinerea*, а в отношении *C. guilliermondii* - 11 и 15 ед., соответственно. МИК рД-Лт для *C. guilliermondii* составила 25мкг/мл.

Для количественного определения различий в величинах активностей двух форм рД-Л проводили подсчёт в СЭМ количества клеток с нарушенной морфологией – раздувшихся, лизирующих после их инкубации при 30⁰ С в течение 3 ч с 20 мкг/мл, а после 5 ч такой инкубации лизировались практически все клетки (табл.1).

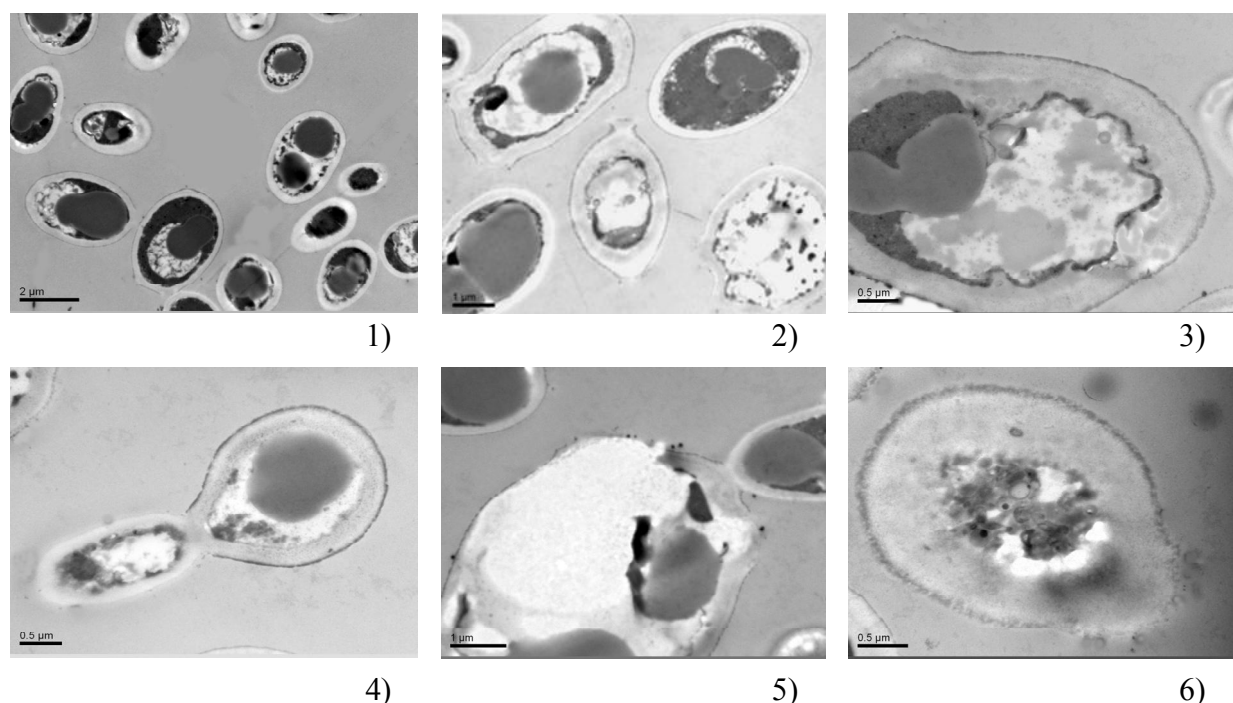


Рис. 4. ТЭМ срезов клеток *Candida guilliermondii*, разрушающихся под влиянием рД-Лт: 1 – контроль, 2 - начало лизиса клеток; 3 – разрыхление и начало расслоения клеточной стенки, просветление цитоплазмы, начало втягивания мембраны; 4 – нарушение наружных слоёв клеточной стенки, их лизис в более молодой почкующейся клетке, потеря значительной части внутренних компонентов клетки; 5 – раздувшаяся за счёт осмотического лизиса клетка; 6 – расслаивание капсулы, локальное её разрушение, образование кольцевых апоптических структур.

Табл. 1.

Процентное содержание лизирующих под влиянием рД-Л и рД-Лт клеток популяции дрожжей

Белок	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Shizosaccharomyces pombe</i>
рД-Л	69,0 ± 7,0	65,8 ± 4,3
рД-Лт	85,3 ± 7,5	78,5 ± 5,2

Примечание: указан процент лизирующих клеток (достоверность $p < 0,05$), средний из 20

фото (полей зрения).

Таким образом, впервые установлено антифунгальное действие рД-Л и рД-Лт на мицелиальные грибы и дрожжи, причём, рД-Лт примерно на четверть более активен - вероятно, благодаря тому, что его модифицированная молекула амфипатична, имеет более выраженные свойства АМБП и поэтому способна с большей лёгкостью приобретать различные конформации (вплоть до амилоидных фибрилл), проявляющие повышенную цитотоксичность по сравнению с исходными олигомерами (Gharibyan et al., 2007). С помощью ТЭМ нами впервые описаны основные признаки лизиса грибных мицелиальных и дрожжевых клеток под действием рД-Л. Возможно, гибель клеток грибов под влиянием рД-Л идёт по пути апоптоза, на такую вероятность указывает большое количество кольцевых мембранных структур, образующихся в процессе лизиса этих клеток. Повышенная антифунгальная активность рД-Лт по сравнению с нативным рД-Л установлена нами впервые для представителей всех семейств лизоцимов.

Изучение антибиотического влияния двух форм рД-Л из медицинской пиявки на бактерий.

Потеря мурамидазной активности рД-Л после прогревания обычно приводит к разному ослаблению антибиотического действия на Грам-положительных бактерий и усилению – на Грам-отрицательных. Особый интерес представляет изучение активности рД-Л на бактерий, которые могут взаимодействовать с клеточным эпителием человека, способствуя склеротизации сосудов (Rosenfeld, Campbell, 2011). Так, МИКи рД-Л и рД-Лт для *Pseudomonas fluorescens* составили 4,5 и 1,5 мкг/мл, соответственно. Патоген беспозвоночных *Moraxella osloensis* также лизировался (МИК 15 мкг/мл) под влиянием рД-Лт (рис.5).

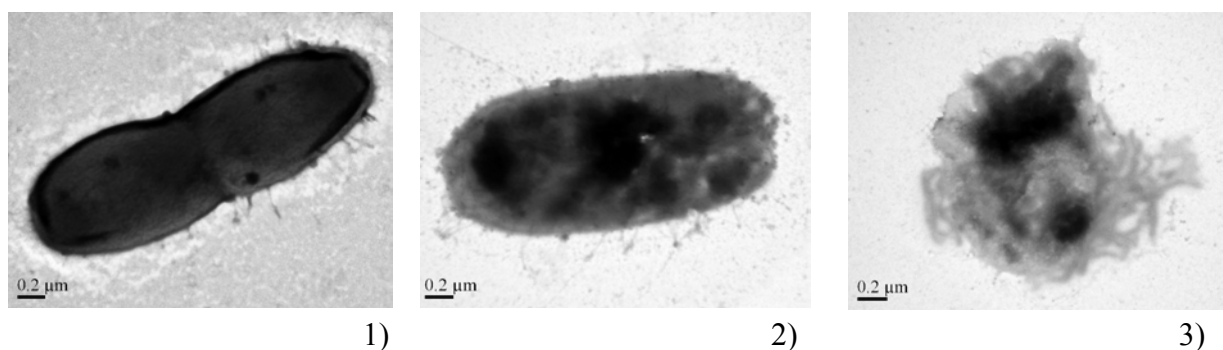


Рис.5. ТЭМ контрастированной фосфовольфрамом клетки *Moraxella osloensis*, лизирующей под влиянием рД-Лт (30 мкг/мл, 1ч, 30°C): 1 – контроль, видна клеточная стенка; 2 – разрушение клеточной стенки, разрыхление цитоплазмы; 3 – остатки лизировавшейся клетки.

В табл.6 представлены результаты сравнения антибактериальных активностей двух форм рекомбинантного лизоцима (растворы одинаковой концентрации 30 мкг/мл). Потеря мурамидазной активности обычно уменьшает эффект лизоцима на Грам-положительных бактерий, и, наоборот, усиливает и расширяет спектр действия в отношении Грам-отрицательных бактерий.

Таблица 2.

Антибактериальная активность (ед.) рД-Л и рД-Лт

<i>Kokuria rosea</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i> . (1 фаза)
70,8	8,5	47,5	2,3	1,3
1,5	52,0	0,5	19,7	17,0

Примечание: в верхней строке показаны значения антибактериальной активности для исходного рД-Л, а в нижней – для рД-Лт без мурамидазной активности.

Следовательно, полифункциональный белок – рекомбинантный лизоцим из медицинской пиявки, способен проявлять свой антимикробный эффект с помощью различающихся механизмов: ферментативных активностей мурамидазной (лизоцимной), гликозидазной, изопептидазной и других (Завалова и др., 2010), мембранотропной активности отдельных АМБП (Thammasirirak et al., 2010), а также конформационно изменённых (Ibrahim et al., 1996; 2005) и структурированных молекул (Gharibyan et al., 2007).

Антибиотический эффект рД-Лт на представителя семейства энтеробактерий - клетки 1 фазы *Xenorhabdus bovienii*, усилился по сравнению с рД-Л более, чем в 10 раз (табл. 2).

Белок рД-Л стабилен, сохраняет свою активность по отношению к *Moraxella osloensis* в течение 2-х лет, однако, теряет активность после прогревания (90°C, 50 мин), в отличие от исходного и хранящегося при +4°C не более нескольких месяцев (табл. 3).

Влияние хранения (при +4°C, 2 года) на антибактериальную активность рД-Л

Белок	МИК, мкг/мл, для <i>Moraxella osloensis</i>
рД-Л, исходный	75
(рД-Л, исходный)t - прогретый	15
рД-Л после хранения	100
(рД-Л после хранения)t - прогретый	0

Мутантные рД-Л с точечными мутациями в каталитических гликозидажном (D26A) или изопептидажном активном центре (K38A) сохраняли часть своей антимикробной активности (табл.3). Это подтверждает, что молекулы рД-Л амфипатичны, способны к ферментативной и неферментативной антимикробной активности.

Табл. 4.

Сравнение антибактериальных активностей рД-Л и мутантных белков

рД-Л и его мутанты	МИК, мкг/мл, для <i>Kokuria rosea</i>
рД-Л исходный	0,8
D26A (точечная мутация белка в каталитическом гликозидажном активном центре привела к потере гликозидазной активности с сохранением изопептидазной)	3,9
K38A (точечная мутация белка в каталитическом изопептидажном активном центре привела к потере изопептидазной активности с	12,5

Исследована электронно-микроскопическая картина лизиса бактерий под влиянием рД-Лт. Причины изменения спектра антибиотического действия рД-Лт в сравнении с рД-Л могут быть обусловлены конформационными изменениями молекулы (Ibrahim et al., 1996; 2005; Horing et al., 2012). Так как доказана способность лизоцима к образованию *in vitro* амилоидных агрегатов, более токсичных, чем исходный белок-олигомер (Gharibyan et al., 2007), то можно также предположить, что подобное структурирование более эффективно проходит у рД-Лт, чем у рД-Л, поэтому антимикробная активность рД-Лт выше. Таким образом, разные формы рД-Л оказывают различающееся антибиотическое действие на грибы, архей, на аэробных и анаэробных бактерий.

рД-Л - стабильный белок, так как сохраняет свою активность без замораживания в течение не менее 2-х лет. Однако, после длительного (2 года) хранения прогревание рД-Л приводит к потере её активности. рД-Лт имеет обычно более широкий спектр антимикробного действия, чем рД-Л. Мутантные формы рД-Л отличаются своей антимикробной активностью. Эти и другие характеристики делают рД-Л перспективным для разработки нового лекарственного тромболитического и антимикробного препарата, которая проходит в настоящее время.

Изучение антимикробного действия белков параспоральных кристаллов ***Bacillus thuringiensis***

Антибиотическое действие Cyt1A на представителей царства грибов.

Ранее не изучали антибиотическое влияние Cyt1A белка на микроскопические грибы, многие из которых обитают в почвенных отходах, других природных эконизах, являясь активными деструкторами. Грибы встречаются и среди симбиотической микробиоты. Известно о различиях в составе клеточных стенок бактерий и грибов (Калебина и др., 2001), поэтому интересно, способен ли Cyt1A белок разрушать клеточные стенки грибов и их мембраны. Лизис клеток дрожжей под влиянием Cyt1A (50 мкг/мл, 3 ч, 30⁰ C) хорошо заметен с помощью светового микроскопа. При подсчёте в СЭМ количества клеток с нарушенной морфологией – раздувшихся, лизирующихся, выявилось, что такие клетки составляют более 2/3 от общего числа клеток через 3 ч инкубации с Cyt1A (табл. 5), а через 5 ч практически все клетки лизируются.

Таблица 5.

Процентное содержание лизирующихся под влиянием Cyt1A клеток дрожжей в их популяции.

Белок	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Shizosaccharomyces pombe</i>
Cyt1A, 50 мкг/мл, 3 ч, 30 ⁰ C	65 ± 3,7	79,1 ± 6,5

Примечание: указан процент лизирующихся клеток, средний из 20 фото (полей зрения). Cyt1A лизирует и клетки некоторых мицелиальных грибов (рис. 6).

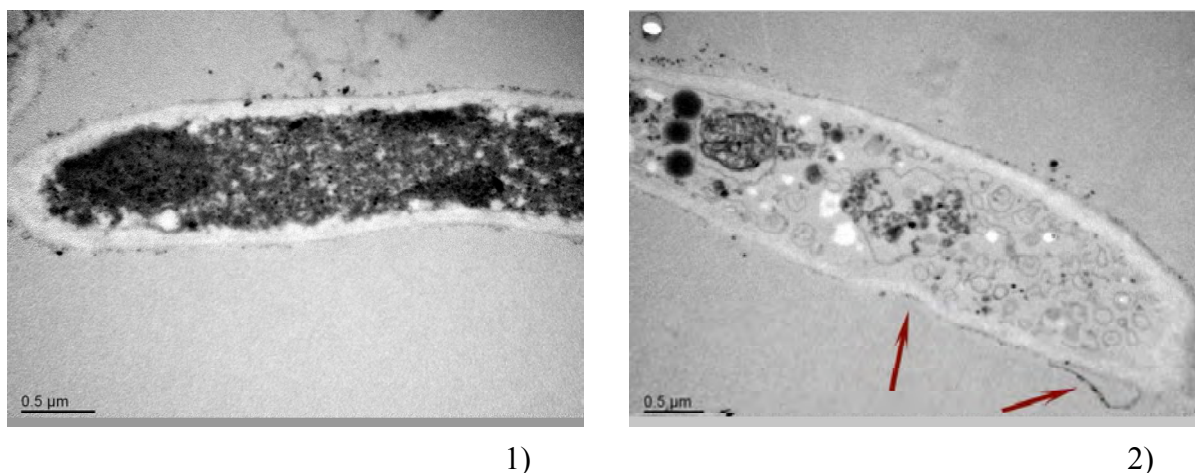


Рис. 6. Лизис *Verticillium lateriticum* под влиянием Cyt1A белка. 1) – контроль; 2-опыт - образование кольцевых мембранных структур, разрушение участков клеточных стенок (отмечено стрелками).

Антибиотическое действие Cyt1A на архей.

Археи имеют уникальное строение как КС, так и ЦМ (Howland, 2000; Beveridge, Schultze-Lam, 1996). Полифункциональные белки рД-Л и Cry оказывают антибиотическое действие на ряд представителей архей, приводящее к лизису их клеток (Завалова и др., 2010; Юдина и др., 2004; Yudina et al., 2007). Археи *Methanosarcina barkeri* оказались чувствительны к антибиотическому влиянию и Cyt1A белка. Вид срезов этих клеток в ТЭМ представлен на рис. 7.

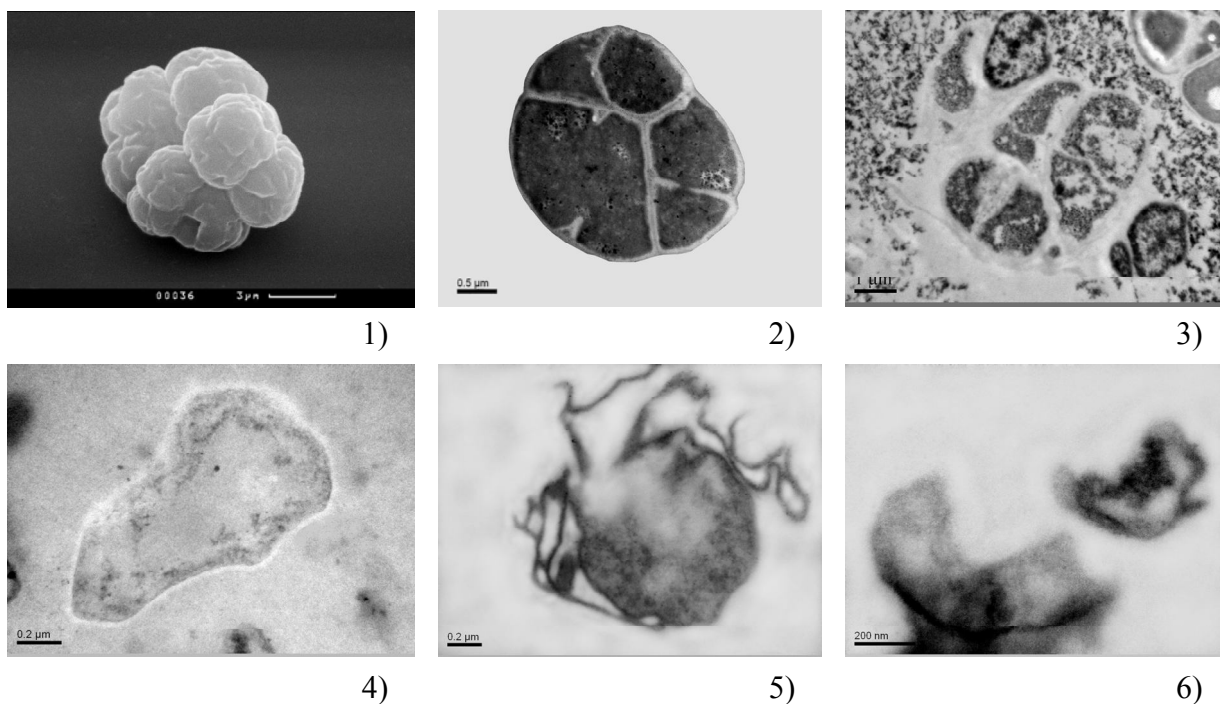


Рис.7. Вид клеток *M. barkeri* в ТЭМ : 1) – контроль, виден конгломерат клеток архея; в ТЭМ: 2) – контроль, срез конгломерата клеток; 3) - вид лизирующегося под влиянием Cyt1A (50 мкг/мл, 1 ч) конгломерата клеток; 4 – 6) – вид отдельных лизирующихся под действием Cyt1A клеток архея.

Исследование влияния Cyt1A белка на клетки Грам-отрицательных бактерий.

Мы исследовали действие Cyt1A на представителей семейства энтеробактерий - *Xenorhabdus bovienii*, являющихся симбионтами почвенных энтомопатогенных нематод, откуда мы их выделили и определили видовую принадлежность. Для диссоциантов 1 фазы *X. bovienii* МИК Cyt1A для *X. bovienii* составляет 12 мкг/мл.

Изучение картины лизиса клеток *Xenorhabdus* с помощью ТЭМ выявило просветление цитоплазмы, нарушение структуры клеточных оболочек, выход внутриклеточного содержимого после 1 часа лизиса клеток под влиянием раствора Cyt1A (Рис. 8). Описанные признаки свидетельствуют о нарушении проницаемости цитоплазматической мембраны (наружной и внутренней), а также о разрушении клеточной стенки, приводящим к осмотическому лизису клеток под влиянием Cyt1A.

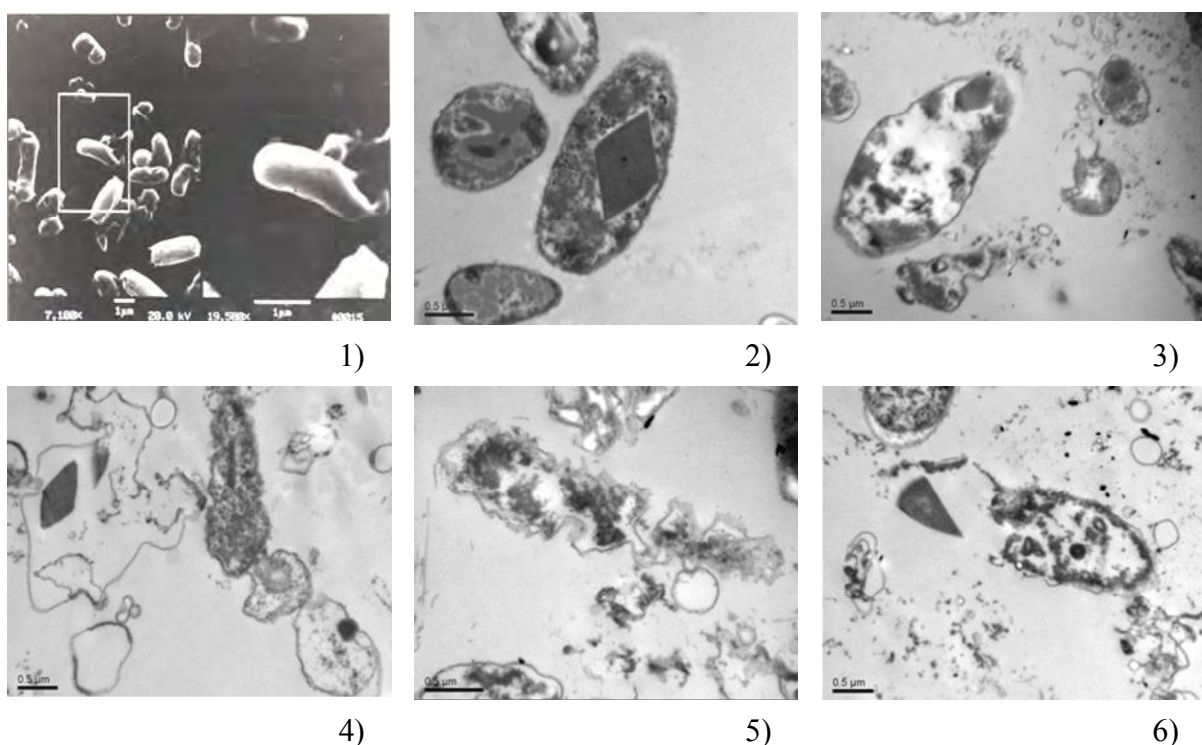


Рис. 8. Вид клеток *Xenorhabdus* sp. 1 фазы в СЭМ (1 – контроль, виден белковый кристалл снаружи клетки) и ТЭМ (2 – контроль, виден белковый кристалл внутри клетки); вид клеток, лизирующихся под действием Cyt-белка из параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* ssp *israelensis* (50 мкг/мл, 1 ч): 3 – разбухание клетки, нарушение её внутреннего содержимого за счёт разрушения клеточной стенки и нарушения проницаемости мембран, 4, 5 – лизис клеток, впячивание цитоплазматической мембраны, образование из неё кольцевых мембранных структур; 6 – разрыв остатков оболочек клетки и выход белкового кристалла. Видны кольцевые остатки мембран лизировавшихся клеток..

Исследование антибиотического влияния Cyt1A белка на клетки Грам-положительных

бактерий при различных условиях их культивирования.

Ранее было установлено антибиотическое влияние Cyt1A на *Micrococcus luteus* (Yudina et al., 2003), затем – на кишечную палочку и стрептококка (Cahan et al., 2008). Картина лизиса под влиянием Cyt1A клеток микрококков в ТЭМ, в общем, сходна с изученной ранее картиной лизиса микрококков под влиянием различных Crg белков (Юдина, Егоров, 1996; Юдина и др., 1996; Yudina et al., 2003). Cyt1A также приводит к разрежению пептидогликана клеточной стенки, отхождению его слоёв, осмотическому разбуханию клеток за счёт нарушения проницаемости их цитоплазматической мембраны, нарушению их внутреннего содержимого, иногда – к образованию кольцевых мембранных структур. Однако, лизис микрококков под влиянием Cyt1A белка проходит в 2 – 5 раз более интенсивнее, чем под влиянием исследованных ранее Crg белков (рис. 9).

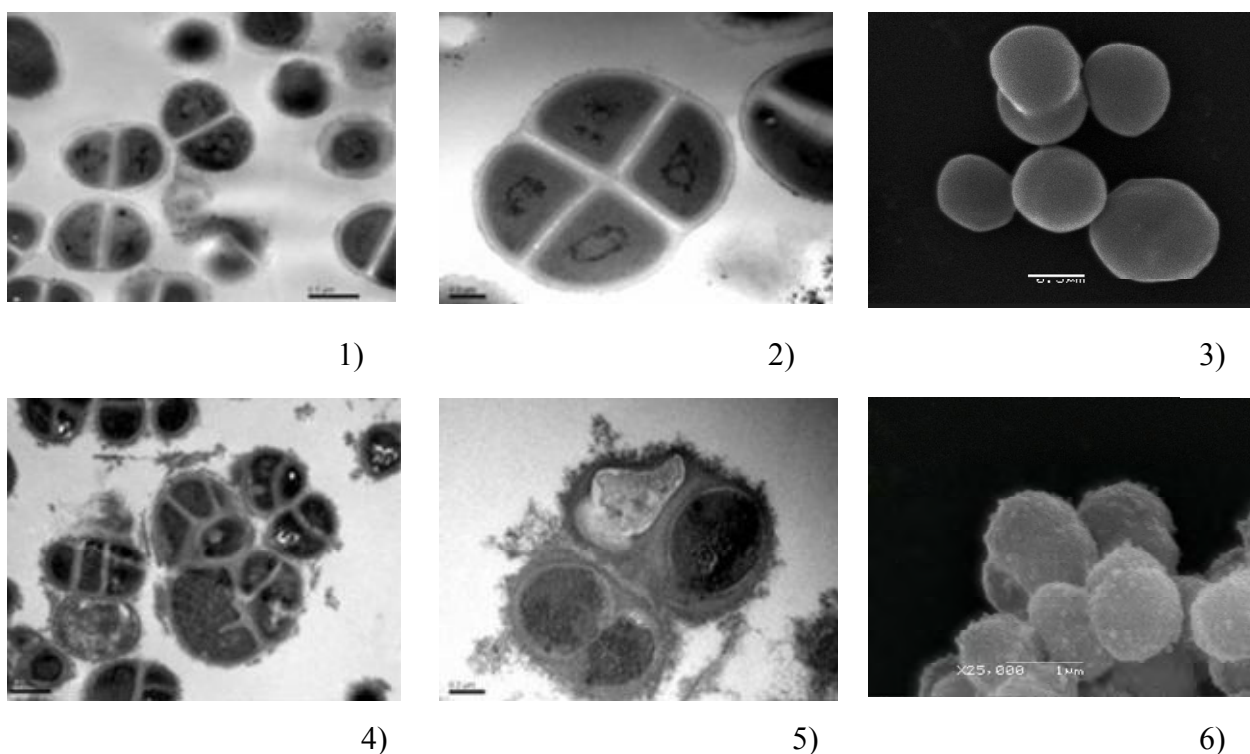


Рис. 9. Вид в ТЭМ и СЭМ начала лизиса клеток микрококков под влиянием Cyt1A (20 мкг/мл, 10 мин). Верхний ряд – контроль, нижний ряд – видно нарушение поверхности клеток, их слипание, разрушение клеточных стенок, разрежение цитоплазмы из-за нарушения проницаемости ЦМ. Это указывает на связывание Cyt1 с КС и его активность по отношению к КС и ЦМ.

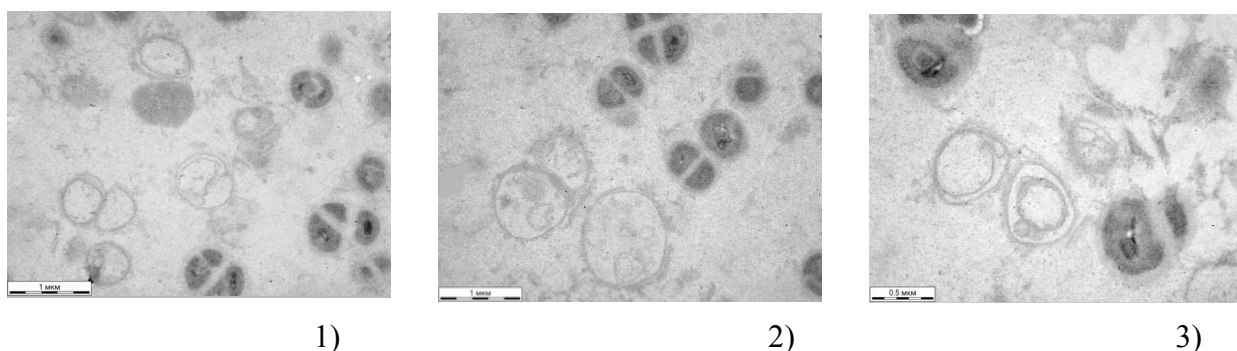


Рис. 10. Вид в ТЭМ лизиса клеток *M. luteus* под влиянием Cyt1A (20 мкг/мл, 30 мин.). Видно разрушение клеточных стенок, разрежение цитоплазмы, осмотический лизис, наличие кольцевых мембран внутри лизирующихся клеток.

Полифункциональные белки кристаллов (особенно в случае, когда они синтезируются трансгенными растениями), могут попадать *in vivo* в инкубационные условия, различающиеся составом ионов и других компонентов (разные ткани растений, организмы животных и другие составляющие почвенных биоценозов), которые способны изменять активность этих белков и их компонентов. Поэтому сравнение антибиотического эффекта белков кристаллов мы проводили, выращивая тест-микроорганизмы на средах разного состава (табл.6). Кроме того, такие различающиеся условия оказывают влияние на рост тест-культур и чувствительность их к антибиотическому действию белков. Действительно, соли, содержащиеся в среде №1, способствуют более активному проявлению антимикробного действия белков кристаллов, чем солевой состав среды №2. Так, активность Cyt1A в этой среде в полтора раза меньше, чем в среде №1(а) (Табл .6).

Таблица 6.

Чувствительность клеток *M. luteus*, растущих на различных питательных средах, к влиянию Cyt1A белка.

Активность Cyt1A, ед., при росте <i>M. luteus</i> на средах №:										
1(а)	1(б)	1(в)	1(д) ²	1(е)	1(г) ¹	1(ж)	2(б)	3(а)	3(б)	3(в)
25,9	22,7	20,1	24,0	17,1	23,1 ¹	0,5 ⁴	17,3	7,3	11,7 ²	19,3 ³

Примечание: ¹рост культуры более длительный и менее интенсивный, чем в 1(а); ²очень слабый рост культуры, зоны подавления роста проявлялись, но не четко; ³рост удовлетворительной интенсивности; ⁴рост средней интенсивности, зоны подавления роста не проявлялись.

Увеличение концентрации добавленного в среду NaCl до 1,25 М (5%) (среда №1(е)) приводило к уменьшению активности Cyt1A в 1,5 раза. Добавление в контрольную среду вместо трипозного бульона 2% глюкозы (среда №1(г)) привело к замедленному росту газона тест-культуры, на котором только примерно через 5 сут. появляются зоны подавления роста, сравнимые с таковыми на контрольной №1(б) среде. Важность солевого состава среды №1(б) для проявления антибактериального действия белков кристаллов особенно наглядно доказывается, если выращивать микрококки на водопроводной воде с таким же количеством трипозного агара (среда №3(а)). В этом случае, несмотря на рост клеток, Cyt1A белок проявлял свою активность примерно втрое слабее, чем на других средах.

Таким образом, чувствительность микрококков к антибиотическому действию Cyt1A в меньшей степени зависит от состава питательных сред, чем к Cry11A (что было исследовано ранее). С другой стороны, полученные данные указывают на существенное значение осмолярности сред для проявления антимикробной активности белков: крупная трёхдоменная молекула Cry11A (70 кДа) более выражено изменяет свою антимикробную активность в разных инкубационных средах, в отличие от Cyt1A (28 кДа).

Cyt1A оказывает антибиотическое влияние, приводящее к лизису не только клеток микрококков – частых обитателей филлопланы, но и типичных обитателей почв – стрептомицетов.

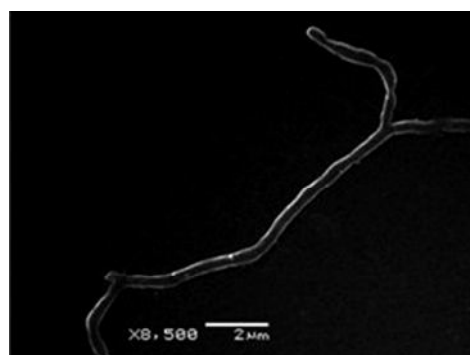
Cyt1A приводил к эффективному разрушению клеток и поверхностных спор стрептомицетов *Streptomyces chrysomallus* (табл.7). Такие споры в 2 – 6 раз устойчивее к антибиотическому действию изученных белков, чем клетки. Стрептомицеты интенсивно росли

также на среде №4(а), однако, антибиотическая активность Cyt1A проявлялась слабо. Замена в среде №4(а) глицерина на трипказин (№4 (б)) способствовала интенсивному росту стрептомицета и проявлению антибиотической активности белка, однако, меньшей, чем на среде Чапека. МИК Cyt1A для стрептомицета на среде Чапека составила около 12 мкг/мл.

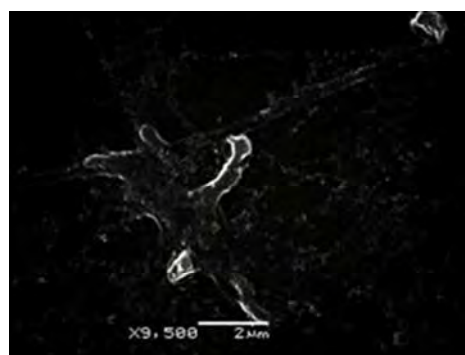
Таблица 7.

Сравнение антибактериальной активности Cyt1A по отношению к клеткам и поверхностным спорам *Streptomyces chrysomallus*, растущим на различных питательных средах.

Белок	Активность, ед.					
	Среда №2		Среда №4(б)		Среда №4(а)	
	споры	клетки	споры	клетки	споры	клетки
Cyt1A	9,1 ± 0,8	21,4 ± 2,1	3,4 ± 0,4	6,5 ± 0,5	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,3



1)



2)

Рис. 11. Лизис *Streptomyces citrofluorescens* под влиянием Cyt1A. 1) – контроль, 2) опыт.

Следовательно, Cyt1A проявляет выраженную антибиотическую активность по отношению к микрококкам и стрептомицетам – типичным обитателям филлопланы, ризопланы и почв.

Таким образом, состав сред, на которых выращиваются тест-микроорганизмы, а также состав инкубационной среды, в которой находятся белки кристаллов, оказывает существенное влияние на проявление их активности, а также на чувствительность тест-микроорганизмов к антибиотическому действию белков. Cyt1A оказывает антимикробный эффект на клетки ряда грамположительных бактерий – типичных обитателей почв, обычно, в общем сходный с эффектом Cry-белков, но в 2 – 5 раз более интенсивный. Минеральные, а также органические компоненты биоценозов оказывают существенное влияние на проявление антимикробной активности Cyt, и особенно - Cry белков. В различных участках почвенных биоценозов соотношение таких белков и их фрагментов различается. Поэтому белки параспоральных кристаллов *B. thuringiensis*, в значительных количествах синтезируемые трансгенными растениями, вероятно, способны негативно влиять на микробиоценозы почв и на некоторых беспозвоночных - почвенных обитателей, симбионтами которых являются прокариоты, чувствительные к Cry и Cyt-белкам.

Определение антимикробного действия Cry3A in vivo.

Ранее антимикробную активность множества белков параспоральных кристаллов *B. thuringiensis* изучали in vitro (Юдина и др., 1988. 1996, 1997; Yudina et al., 2003, 2007, 2011). Было

показано при культивировании тест-культур в жидких и на твёрдых средах, а также с помощью электронно-микроскопических методов, что Cry белки параспоральных включений *Bt* оказывают антибиотическое действие на ряд прокариот, в том числе – на клостридий, различные виды которых могут быть как свободно живущими обитателями почв, так и симбионтами кишечника животных (Юдина, 2006; Yudina et al., 2007).

В данной работе мы подтвердили *in vivo*, что такая чувствительность есть и у клостридий, обитающих в кишечнике личинок насекомых. В качестве модели исследовали влияние Cry3A белка, образующего параспоральные кристаллы у бактерий *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, токсичного для личинок мучного хрущака *Tenebrio molitor*, на клостридий, обитающих в средней кишке этих личинок. Количественный учёт выросших через сутки клеток показал, что в опыте число клеток было в 150 раз меньше, чем в контроле, значит, в посевном материале опыта было значительно меньше спор, чем в контрольном. В контроле выросло за сутки на селективной среде для клостридий ($5,7 \times 10^9$) клеток многообразной морфологии, а в опыте – только ($3,8 \times 10^7$), так как клетки клостридий – симбионтов погибли в результате антибиотического влияния Cry3A белка. В опыте проросли клетки только из оставшихся спор. При СЭМ выросших анаэробов установлено, что в контроле морфология клеток, выросших на селективной среде для клостридий, была более разнообразна, чем в опыте. Выросшие клетки были чувствительны к антибиотическому действию Cyt белка и рД-Л. Кроме того, только из погибших личинок с помощью метода ацетатной селекции нам удалось выделить культуру *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Количество кристаллообразующих бацилл, выделенных из средней кишки погибших личинок, составило $5,2 \times 10^7$ /мл. СЭМ показала, что выделенная культура – это *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, что определили по характерной форме параспоральных кристаллов. В средней кишке контрольных личинок бациллы, причём, не кристаллообразующие, находились в небольшом количестве – ($0,2 \times 10^2$ /мл). В муке обнаружили мало бацилл – 5/мл, некристаллообразующих. Проведённые *in vivo* эксперименты дают основание полагать, что *in vivo* полифункциональный Cry3A привёл к гибели личинок благодаря своей высокоспецифичной инсектицидной активности и способствовал преимущественному развитию в них из спор подвида *tenebrionis* популяций этих бактерий благодаря своей антимикробной активности. Именно эти две способности полифункциональных белков *Bt* определяют их основную экологическую роль – создавать благоприятные условия для развития из спор молодых дочерних популяций, обеспечивая их питанием в новых экологических нишах и защищая от микроорганизмов-конкурентов при завоевании таких ниш (Юдина, 2006; Yudina et al., 2007).

Фибриллы на поверхности параспоральных кристаллов *B. thuringiensis*

ТЭМ позволила нам обнаружить фибриллы на поверхности кристаллов разных подвигов *B. thuringiensis*, о чём ранее сведений в литературе нет (рис. 12 - 14).

Важно отметить, что Cyt и Cry белки могут формировать общие белковые включения (см. рис.14, 1), что описано многими исследователями (Tam, Fitz-James, 1986; Federici, 2005). Большинство кристаллов *B. thuringiensis*, как известно, содержит несколько разных Cry белков (Crickmore, 2013). Из этого можно предположить, что фибриллы также могут формироваться разными белками, из которых состоят включения одного подвида *B. thuringiensis*.

Наибольшее количество фибрилл наблюдали вокруг кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *amagiensis*, серотип H29 (рис. 15).

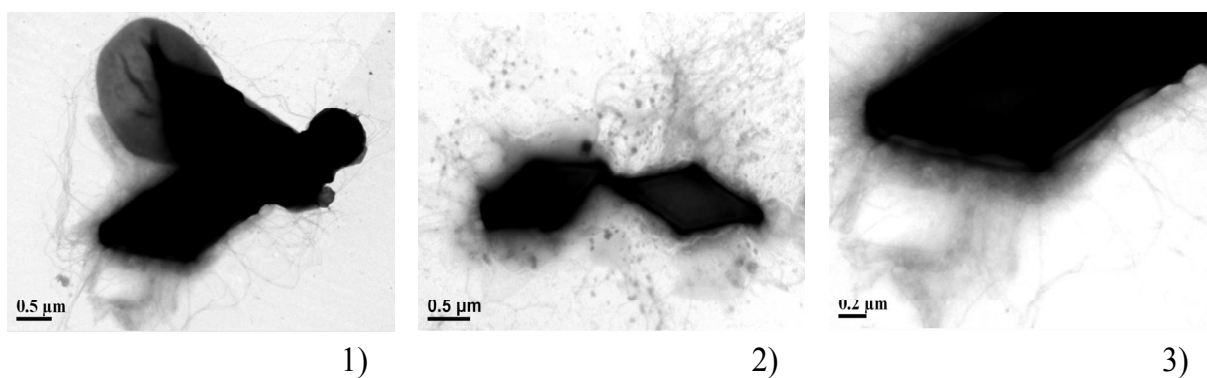


Рис. 15. Кристаллы *B. thuringiensis* subsp. *amagiensis*. 1) кристалл и спора, соединённые выростами споры и фибриллами кристалла, 2) два кристалла, соединённые фибриллами, 3) кристалл с фибриллами.

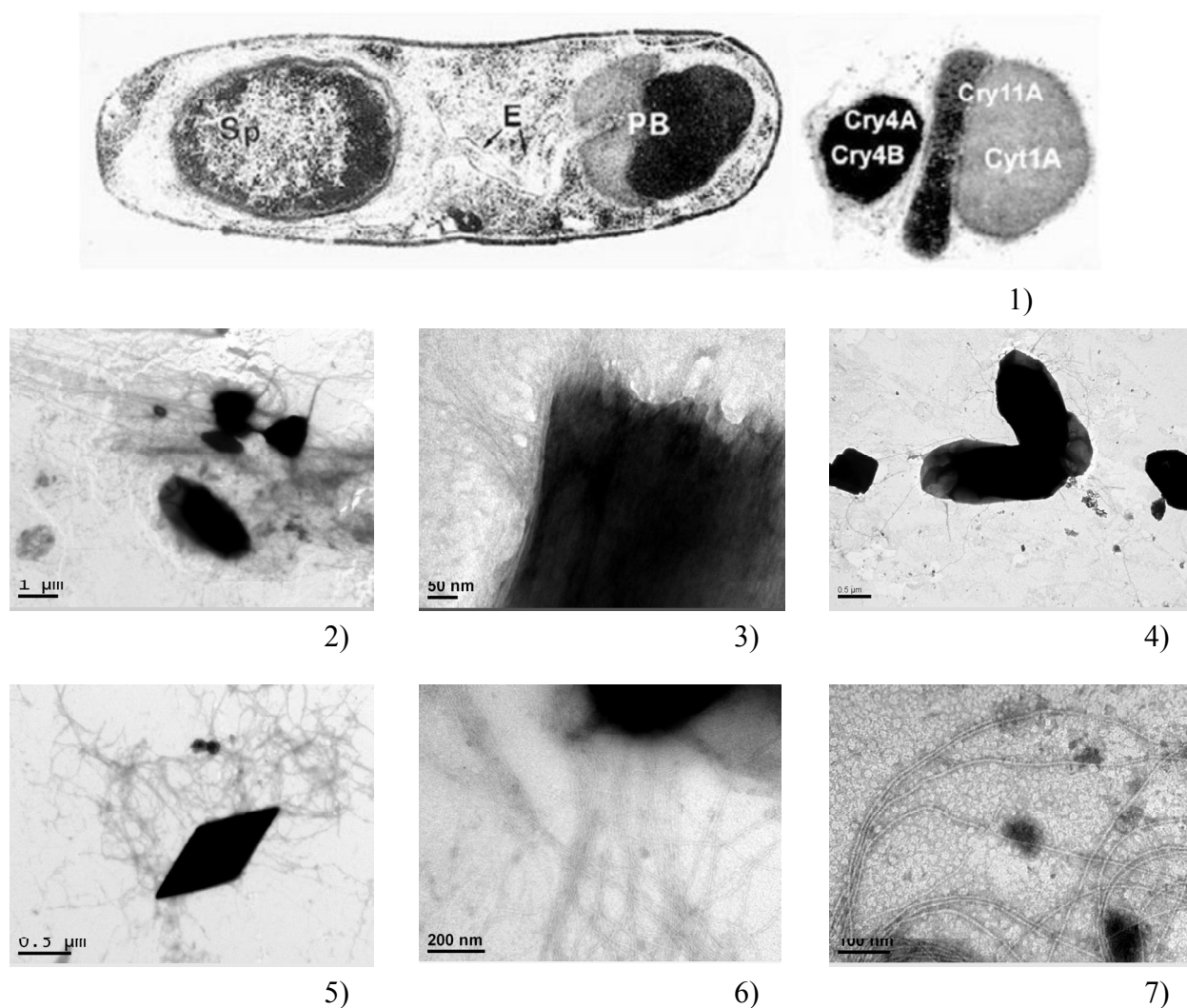


Рис. 14. ТЭМ кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (1 -3) и *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (4 – 7). 1) Срез клетки Bti с кристаллами из разных белков (Tam, Fitz-James, 1986); 2)

спора и кристаллы *Bti*, 3) часть кристалла *Bti* с отходящими от него фибриллами; 4) споры и кристалл *Bt kurstaki*; 5 – 7) кристалл с отходящими от него фибриллами.

Важно отметить, что фибриллы вокруг кристаллов имеют разную толщину, степень их упорядоченности самая высокая вблизи кристалла. На рис. 16 представлены фибриллы разной степени упорядоченности. Вид этих фибрилл очень похож на вид амилоидных фибрилл, образуемых разными белками, представленный во множестве публикаций (Scrocchi et al., 2003; Nilsson, 2004; Kalebina et al., 2008). Взаимодействие фибрилл с красителем Конго красным наблюдается в поляризационно-интерференционном микроскопе (фото в диссертации) в виде зелёного окрашивания, что считается диагностическим тестом на присутствие амилоидных фибрилл. (Nilsson, 2004).

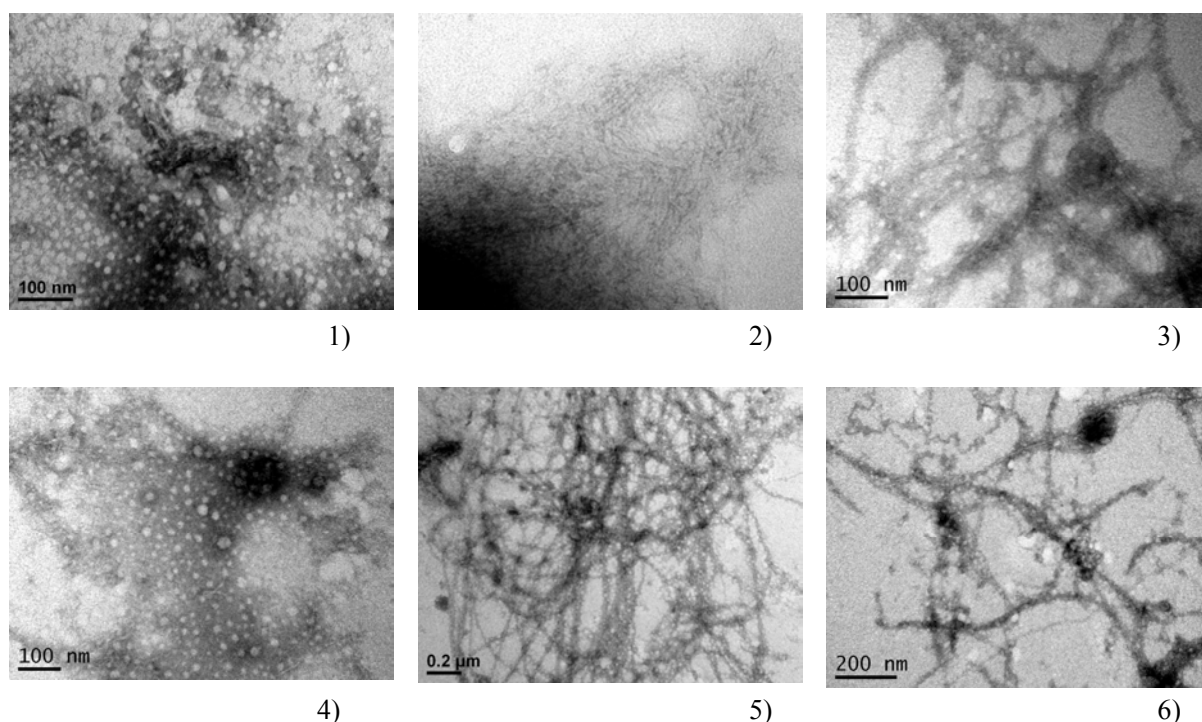


Рис.16. Фибриллы разной степени упорядоченности, окружающие кристаллы *B. thuringiensis*.

Полифункциональность белков кристаллов *B. thuringiensis*, их антимикробная активность, наличие нескольких активных доменов в молекуле и другие свойства, а также полученные нами данные, дают основание считать, что белки кристаллов *B. thuringiensis* амилоидогенны, способны к образованию фибрилл. Может быть, фибриллы участвуют в формировании кристаллов (это предположение требует исследований).

Наличие фибрилл имеет положительное экологическое значение. Благодаря фибриллам кристаллы легче адсорбируются на разных поверхностях, соединяются между собой и со спорами, что необходимо для оптимального выполнения их биологических функций. Кроме того, амилоидным фибриллам разных белков присуща цитотоксичность, они индуцируют агглютинацию бактерий (Torrent et al., 2012) – значит, кристаллы ещё до своего растворения в кишечнике чувствительных беспозвоночных начинают выполнять свою мембранотропную функцию, нарушая, во-первых, проницаемость ЦМ клеток жертвы, а также могут связываться с КС конкурентных *Bt* микроорганизмов кишечника, разрушая её и нарушая проницаемость ЦМ,

что приводит к гибели этих микроорганизмов.

Мы определили, что кристаллы *B. thuringiensis* subsp. *amagiensis* состоят из белков с мол. массами 52,5 кДа (главная полоса), 43 кДа и 28 кДа (ЭФ в ПААГ в диссертации). Ранее данные о белках кристаллов этого подвида не были опубликованы, что указывается в каталоге белков кристаллов *B. thuringiensis* (Crickmore, 2013 http://www.biols.susx.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/) Уникальные белки кристаллов *B. thuringiensis* subsp. *amagiensis* проявляют самую высокую антибактериальную активность среди всех других изученных белков кристаллов *B. thuringiensis* (Юдина, 2006).

Влияние условий инкубирования на антибиотическую активность белков параспоральных кристаллов *B. thuringiensis*.

При изучении механизмов антимикробного действия АМБП необходимо исследование их влияния не только на ЦМ, но и на КС. Ранее было установлено, что разные препараты КС и некоторые их компоненты, добавленные к инкубационной среде, стимулируют антибиотическую активность Cry9A белка (Yudina et al., 2007). Мы продолжили эти исследования с целью установить причину данного явления. Белки Cry3A и Cyt1A усиливают свой антибактериальный эффект, если предварительно (перед внесением в лунки в агаризованной среде с тест-культурой) их инкубируют 1,5 - 3 ч в среде с коммерческим препаратом КС *Micrococcus luteus*, а также – с N-ацетил-D-галактозамином (GalNAc). Прединкубация белков с обоими этими компонентами дополнительно увеличивает антибактериальное действие в несколько (2 – 6) раз, то есть, оказывает синергический эффект (табл. 8, 9).

Табл. 8.

Влияние N-ацетил-D-галактозамина и препарата КС *Micrococcus luteus* на антибактериальную активность Cry3A белка по отношению к *Kokuria rosea*

Вариант опыта	Антибактериальная активность, уд. ед.
Cry3A (контроль, К)	1,2 ±0,1
К + КС <i>M. luteus</i>	3,0±0,4
К + GalNAc	3,9±0,3
К + КС <i>M. luteus</i> + GalNAc	21,1±1,9

Примечание. Во всех вариантах опыта концентрация белка 20 мкг/мл, концентрация добавленного компонента 50 мкг/мл, они не проявляют антибиотическую активность.

Табл.9.

Влияние GalNAc и препарата КС *M. luteus* на антибактериальную активность Cyt1A по отношению к *Streptomyces citrofluorescens*.

Вариант опыта	Антибактериальная активность, уд. ед.
Cyt1A (контроль, К)	2,5 ±0,3
К + КС <i>M. luteus</i>	5,1±0,6
К + GalNAc	6,3±0,7
К + КС <i>M. luteus</i> + GalNAc	16,8±1,8

Примечание. Во всех вариантах опыта концентрация белка 15 мкг/мл, концентрация добавленного компонента 50 мкг/мл, они не проявляют антибиотическую активность.

Мы исследовали с помощью ТЭМ структурированность инкубационной среды (Cry3A + КС *M. luteus*+ GalNAc) и обнаружили, что белки кристаллов образовали фибриллы (рис. 17).

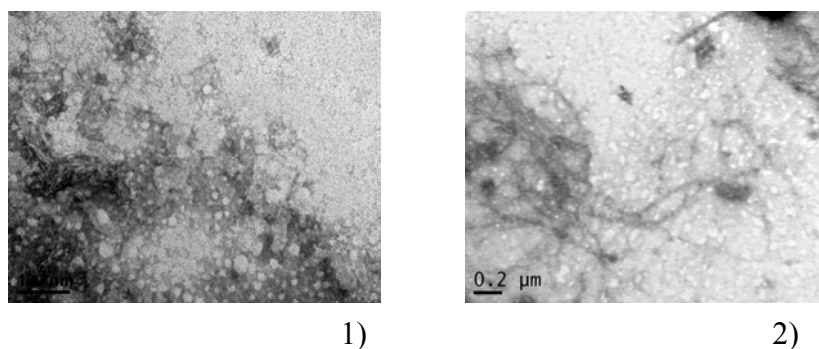


Рис. 17. Вид в ТЭМ инкубационной среды (белок Cry3A + КС *M. luteus* + GalNAc) через 2 сут после опыта: слева - контроль, раствор Cry3A; справа – опытная инкубационная среда с Cry3A, видны фибриллы.

Таким образом, проведённые исследования дают основание предполагать, что КС *M. luteus* и GalNAc, а в ещё большей степени - их смесь, с которыми прединкубируют белки кристаллов перед опытом, активируют процессы образования амилоидных фибрилл белками кристаллов Bt. Как установлено для разных белков, амилоидные агрегаты проявляют большую цитотоксичность, чем олигомеры, хотя механизм этого явления пока не установлен (Gharibyan et al., 2007). Это и является, по-видимому, основной причиной возрастания антибактериальной активности белков кристаллов, прединкубированных с КС или некоторыми её компонентами.

Мы также исследовали **влияние экзогенных биогенных аминов серотонина и дофамина**, добавленных к инкубационной среде с Cry3A белком, на его антибактериальное действие (Табл.10).

Таблица 10.

Влияние серотонина и дофамина на антибактериальную активность Cry3A белка по отношению к *Streptomyces citrofluorescens*.

Растворы, добавленные к инкубационной смеси до концентрации:	Антибактериальная активность, уд. ед
Контроль 0,05М Трис-HCl (pH 8,6) (I)	20,7±2,1
I + Cry 3A до 35мкг/мл (II)	1,9± 0,2
I + дофамин до 2 мкг/мл	21,5±2,4
II + дофамин до 2 мкг/мл	2,6±0,2
I + серотонин до 2 мкг/мл	21,1±2,3
II + серотонин до 2 мкг/мл	18,7±1,3

Серотонин, в отличие от КС и некоторых её компонентов, ослабляет антибактериальный эффект Cry3A, а дофамин практически не оказывает на него влияния. По-видимому, серотонин уменьшает проницаемость клеточных оболочек, и, таким образом, существенно ослабляет антибиотическое действие Cry3A. Также возможно, что серотонин связывается с теми же участками на клеточной оболочке, с которыми должен был бы связываться и Cry3A, закрывая белку к ним доступ. Проницаемость клеточных оболочек под влиянием дофамина в использованных концентрациях не изменяется, в отличие от влияния серотонина. Дофамин, как и серотонин, немного усиливает интенсивность роста тест-культур на газоне.

Синергизм антибактериального действия Cyt1A и pД-Lt определили, исследуя влияние каждого из этих белков, а также их смеси, на *Kokuria rosea* (табл. 11).

Табл. 11.

Синергизм антибактериального действия Cyt1A и рД-Лт.

Вариант опыта	Антибактериальная активность, уд. ед., по отношению к <i>Kokuria rosea</i>
Cyt1A, 20 мкг/мл	27,5 ±3,6
рД-Лт, 20 мкг/мл	7,1±0,7
Cyt1A+ рД-Лт, 20 мкг/мл	120,7±11,9

Смоделированные варианты инкубационных сред могут возникать и *in vivo*, т.к. в организме чувствительного животного есть как биогенные амины, так и клетки многих прокариот. Поэтому такие опыты представляют собой частичный анализ реакций иммунного ответа на цитотоксические полифункциональные АМБП.

ВЫВОДЫ.

1. Проведено сравнительное исследование антимикробного действия двух форм рекомбинантного белка Дестабилазы-Лизоцима (рД-Л и рД-Лт) на аэробные и анаэробные бактерии и на микроскопические грибы. Показано, что рД-Лт, лишённый мурамидазной активности, оказывает больший антибиотический эффект на Грам-отрицательные бактерии, а также на грибы, чем нативный рД-Л. Усиление антифунгальной активности лизоцима, лишённого мурамидазной активности, установлено впервые.
2. Изучено антибиотическое влияние Cyt1A белка из параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, рД-Л и рД-Лт на выделенных из энтомопатогенных нематод бактерий-симбионтов *Xenorhabdus bovienii*.
- 3). Проявление антибиотической активности Cyt1A белка зависит от состава сред для роста тест-микроорганизмов, но - в меньшей степени, чем установленная ранее таковая зависимость для Cту белков.
- 4) Впервые показано *in vivo*, что антимикробная активность Cry3A *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis*, приводит к гибели значительного количества клостридий-симбионтов в средней кишке мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Эти клостридии чувствительны также к антибиотическому влиянию рД-Л и Cyt1A.
- 5). Впервые на поверхности кристаллов трёх изученных подвидов *B. thuringiensis* обнаружены амилоидные фибриллы. Больше всего фибрилл на поверхности кристаллов *B. thuringiensis* ssp. *amagiensis*, состоящих из белков, молекулярная масса которых, ранее неизвестная, определена электрофоретически.
- 6). Препарат бактериальных клеточных стенок и GalNAc, с которыми прединкубируют белки кристаллов перед определением их антибактериальной активности, активируют образование амилоидных фибрилл белками *B. thuringiensis*. Сделано предположение, что это является, по-видимому, основной причиной возрастания антибактериальной активности белков кристаллов, прединкубировавшихся с КС или некоторыми её компонентами. Смесь КС и некоторых её компонентов оказывает синергический эффект, многократно усиливая активность белков кристаллов.
- 7). Биогенные амины, добавленные к инкубационной среде, влияют на антибиотический

эффект Cry3A: серотонин его ослабляет, а дофамин практически не влияет.

8). Смесь полифункциональных белков Cyt1A и рД-Лт проявляет значительно большую антибактериальную активность, чем каждый отдельный этот белок (синергический эффект). Смоделирован *in vitro* анализ некоторых реакций иммунного ответа на цитотоксические полифункциональные АМБП.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Юдина Т.Г., Залуний И.А., Кирсанова Л.А., Го Даньян, Булушова Н.В., Нетрусов А.И. Сравнение антимикробного действия Cyt, Cry белков *Bacillus thuringiensis* и их фрагментов // Бюлл. МОИП. Отд. Биологический, 2009. Т. 114, Прил.1, Ч.2, С. 516-522.
2. Т.Г. Юдина, Го Даньян, А.И. Нетрусов. Антибиотическое влияние δ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis* на бактерии и дрожжи // Сборник «Актуальные проблемы биологической безопасности», посвященный 300-летию со дня рождения М.В.Ломоносова. Брянск, 2011. С.154-162.
3. T.G.Yudina, I.A. Zalunin, A.P. Zarubina, Danyang Guo, N.S. Shepeleva, S.E. Spiridonov Antimicrobial activity of protein inclusions from bacteria symbiotic with entomopathogenic nematodes. *Russian Journal of Nematology*, 2011. 19(2), P.181-188.
4. T.G. Yudina, I.A. Zalunin, Danyang Guo, A.I. Netrusov. The influence of bacterial cell walls preparations and some of their components on antibiotic activity of Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis*. ISTECC-2011, Istanbul. The proceedings book, 2011. P. 812 – 817.
5. T. G. Yudina, Danyang Guo, N. F. Piskunkova, I. B. Pavlova, L. L. Zavalova, I. P. Baskova. Antifungal and antibacterial functions of medicinal leech recombinant destabilase-lysozyme and its heated-up derivative. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2012. 6(2), P. 203-209.
6. Го Даньян, Павлова И.Б. Сравнение антибиотического действия секрета слюнных клеток медицинской пиявки и фермента дестабилазы-лизоцима, входящего в состав этого секрета // Медицинский академический журнал. Приложение. Санкт-Петербург, 2012. С. 485-486.

Тезисы конференций:

1. Го Даньян, Юдина Т.Г., Залуний И.А., Жужиков Д.П., Лютикова Л.И., Нетрусов А.И. Антибактериальный эффект Cry3A белка кристаллов *Bacillus thuringiensis* *in vivo* в кишечнике личинок *Tenebrio molitor* // Материалы всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» М:МАКС Пресс, 2009. С.56.
2. Го Даньян, Юдина Т.Г., Нетрусов А.И. Морфологические изменения клеток микроорганизмов, лизирующихся под влиянием белков параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* // Материалы всероссийского симпозиума с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» М:МАКС Пресс, 2010. С.32
3. Го Даньян, Залуний И.А., Пискункова Н.Ф., Юдина Т.Г., Нетрусов А.И., Егоров Н.С. Антибиотическое действие Cyt1A-белка из параспоральных кристаллов *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* на микроскопические грибы // Материалы всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов». Москва, 2011. С.32
4. Danyang Guo, L.L. Zavalova, N.F. Piskunkova, T.G. Yudina, I.P. Baskova. The effect of heat-denaturation of recombinant Destabilase-Lysozyme from medicinal leech on its antifungal and antibacterial functions. Asian Congress on Biotechnology. Shanghai, 2011. P.245

5. **Го Даньян, Н.С.Шепелева.** Влияние инсектицидных белков *Bacillus thuringiensis* на бактерий-симбионтов энтомопатогенных нематод // Материалы VII Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». Москва, 2011. С.98-100
6. **Guo Danyang, Yudina T.G., Netrusov A.I.** Morphological changes in the Prokaryotes lysed by protein in crystal-like inclusions of *Bacillus thuringiensis* (in chinese). Fourteenth National Conference on Environmental Microbiology. Xiamen, The proceedings book, 2011. P.308.
7. **Т.Г. Юдина, Го Даньян, И.Б. Павлова, И.П. Баскова.** Чувствительность стрептомицетов к антибиотическому действию секрета слюнных клеток медицинской пиявки // Тезисы докл. Съезда микробиологов Узбекистана. Ташкент, Секция 3, 2012. С. 140 – 141.
8. **Т.Г. Юдина, Го Даньян, И.Б. Павлова, В.Н. Лазарев, Л.Л. Завалова, И.П. Баскова.** Антимикробное действие секрета слюнных клеток медицинской пиявки, рекомбинантного дестабилазы-лизозима и его мутантных форм // Материалы Междунар. Конф. Ассоциации гирудологов 2012. Харьков, 2012. С. 59 – 60.
9. **Го Даньян.** Антибактериальная активность двух форм перспективного лекарственного препарата - рекомбинантной дестабилазы-лизозима из медицинской пиявки // Тезисы докл. Секции «Биология» XIX международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012». Москва, 2012. С.168.
10. **Guo Danyang, T.G. Yudina, I.B. Pavlova, A.I. Shestakov, A.I. Netrossov, I.P. Baskova.** Development and Application of Novel Thrombolytic and Antimicrobial Agent and Probiotic Preparations (in chinese.) The 15th Guangzhou Convention of Oversea Chinese Scholars in Science and Technology ("OCS"). Guangzhou, The proceedings book, 2012. P.317.
11. **Го Даньян, Павлова И.Б.** Сравнение антифунгального эффекта секрета слюнных клеток медицинской пиявки и его компонента - рекомбинантного фермента «дестабилазы-лизозима» // Тезисы докл. Секции «Биология» XX международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013». Москва, 2013. С.190-191.

Автор благодарит коллег, оказавших большую помощь в работе: И.А. Залунина, Г.Г. Честухину, Н.В. Булушову (ГОСНИИГенетика), Л.Л. Завалову (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН), В.Н. Лазарева (ФГУ НИИ ФХМ ФМБА), а также всех сотрудников кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова.