

DOI: 10.7868/S3034574X26050011

Обзор

УДК 577.15

L-АЛАНОИЛ-D-ГЛУТАМАТПЕПТИДАЗЫ БАКТЕРИОФАГОВ

Г. В. Микулинская

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Российская Федерация

E-mail: mikulinskaya@bibch.ru

Аннотация. В обзоре суммированы данные об охарактеризованных к настоящему времени L-аланоил-D-глутаматпептидазах семейства пептидаз M15, подсемейства С (КФ 3.4.24.B24). Мишень этих цинксо-державших гидролаз — пептидогликан клеточных стенок бактерий. Рассмотрены биологическая роль, физико-химические свойства, ферментативная активность, структурные особенности L-аланоил-D-глутаматпептидаз, их субстратная и бактериоспецифичность. Обсуждается роль иона кальция как структурного регулятора, а также значение периплазматической активации как результата коэволюции бактериофагов с их грамотрицательными хозяевами. Проанализированы перспективы применения L-аланоил-D-глутаматпептидаз в биотехнологии — не только в качестве антибактериальных средств, альтернативных антибиотикам, но и в нетерапевтических целях для развития и совершенствования методов молекулярной биологии.

Ключевые слова: лизис бактерий, эндолизины бактериофагов, кальциевая регуляция, антибактериальные свойства

Финансирование. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Автор данной работы заявляет, что конфликт интересов отсутствует.

Благодарность. Автор благодарен Одиноквой И.В. (ИТЭБ РАН) за помощь с иллюстрациями и Архиповой О.В. (ИБФМ РАН) за обсуждение текста.

Ссылка для цитирования: Микулинская Г.В. L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофагов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 5. С. 653–673. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26050011>

© Г. В. Микулинская, 2026

Сокращения: Даб — 2,4-диаминобутират, ДАП — мезодиаминопимелиновая кислота, ПГ — пептидогликан, ВАРТА — 1,2-бис(2-аминофенокси)-этан-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота, EGTA — этиленгликольтетрауксусная кислота, GST — глутатион-S-трансфераза, SHH — семейство белков Sonic Hedgehog.

DOI: 10.7868/S3034574X26050011

Review

L-ALANOYL-D-GLUTAMATE PEPTIDASES OF BACTERIOPHAGES

G.V. Mikoulinskaia

*Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Russian Federation*

**E-mail: mikulinskaya@bibch.ru*

Abstract: The review summarizes data on L-alanoyl-D-glutamate peptidases of the M15 peptidase family, subfamily C (EC 3.4.24.B24) characterized to date. The target of these zinc-containing hydrolases is peptidoglycan of bacterial cell wall. The physicochemical properties, enzymatic activity, and structural features of L-alanoyl-D-glutamate peptidases, as well as their substrate and bacterium specificity, are discussed. The role of calcium as a structural regulator for several representatives is discussed, as is the significance of periplasmic activation as the result of the coevolution of bacteriophages with their Gram-negative hosts. The potential applications of L-alanoyl-D-glutamate peptidases in biotechnology are analyzed — not only as antibacterial alternatives to antibiotics, but also for non-therapeutic purposes for the development and improvement of molecular biology methods.

Keywords: bacterial lysis, bacteriophage endolysins, calcium regulation, antibacterial properties

Funding: This work was funded by the institute's budget.

Ethics declarations: This article does not contain any studies involving humans or animals as subjects.

Conflict of interests: The author of this work declares that there is no conflict of interest.

Acknowledgements: The author is grateful to I.V. Odinkova (ITEB RAS) for assistance with illustrations and to O.V. Arkhipova (IBFM RAS) for discussion of the text.

For Citation: Mikoulinskaia G.V. L-Alanoyl-D-Glutamate Peptidases of Bacteriophages. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(5):653–673. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26050011>

L-АЛАНОИЛ-D-ГЛУТАМАТПЕПТИДАЗЫ
БАКТЕРИОФАГОВ

ЛИТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ БАКТЕРИОФАГОВ

Процесс разрушения клетки бактерии-хозяина «изнутри», осуществляемый литическим хвостатым бактериофагом на завершающем этапе жизненного цикла для выхода зрелого фагового потомства в окружающую среду, включает несколько этапов [12, 15, 101, 103]. Каждая стадия лизиса опосредуется белками бактериофага, синтезируемыми в цито-

плазме клетки-хозяина; состав литических белков варьирует в зависимости от строения клеточной стенки (рис. 1). Минимальная литическая система бактериофага, инфицирующего грамположительную бактерию, представлена диадой белков холин-эндолизин (рис. 1а). У фагов грамотрицательных бактерий имеются также спанины (рис. 1б), у фагов микобактерий – дополнительные ферменты-эстеразы, способные разрушать миколит-арабиногалактан (рис. 1в) [73].

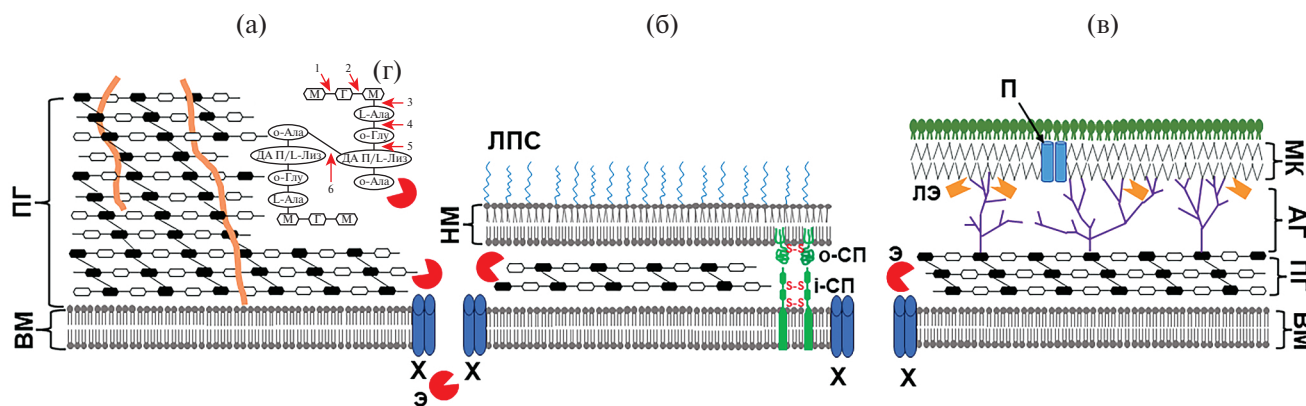


Рис. 1. Схемы разрушения клеточной стенки бактерий (а – грамположительных, б – грамотрицательных, в – микобактерий) изнутри белками бактериофагов. Цифрами на схеме строения пептидогликана (г) указаны связи-мишени эндолизин: 1 – N-ацетил-β-D-мурамидаз и трансгликозилаз, 2 – N-ацетил-β-D-глюкозаминидаз, 3 – N-ацетилмурамил-L-аланинамидаз, 4 – L-аланоил-D-глутаматпептидаз, 5 – D-глутаминилпептидаз, 6 – эндопептидаз. Буквенные обозначения: АГ – арабиногалактан, ВМ – внутренняя мембрана, ЛПС – липополисахарид, ЛЭ – литическая эстераза, МК – миколовые кислоты, НМ – наружная мембрана, П – порин, ПГ – пептидогликан, Х – холин, Э – эндолизин, i-СП – «внутренний» спанин, o-СП – «наружный» спанин

Fig. 1. Schemes of destruction of bacterial cell walls (a – Gram-positive, б – Gram-negative, в – mycobacteria) from within by bacteriophage proteins. Numbers in the scheme of the peptidoglycan structure (г) indicate the target bonds of endolysins: 1 – N-acetyl-β-D-muramidases and transglycosylases, 2 – N-acetyl-β-D-glucosaminidases, 3 – N-acetylmuramyl-L-alanine amidases, 4 – L-alanoyl-D-glutamate peptidases, 5 – D-glutaminy l peptidases, 6 – endopeptidases. Letter designations: AG – arabinogalactan, IM – inner membrane, LPS – lipopolysaccharide, LE – lytic esterase, MA – mycolic acids, OM – outer membrane, P – porin, PG – peptidoglycan, H – holin, E – endolysin, i-sp – “inner” spanin, o-sp – “outer” spanin

Холин – белок, содержащий один или несколько трансмембранных доменов, обеспечивающих его локализацию во внутренней мембране клетки (рис. 1). Биологическая роль холина заключается в деполяризации мембраны и образовании в ней пор различного размера. Канонические холины, накапливаясь в мембране, олигомеризуются и формируют 1–3 крупные поры размером до 1 мкм [102]. Неканонические пинхолины, встречающиеся у фагов с SAR-эндолизинами, также олигомеризуются, но образуемые в мембране поры небольшие и многочисленные [102].

Деполяризация мембраны необходима для обеспечения второй стадии лизиса – деструкции пептидогликана (ПГ) клеточной стенки ферментами-эндолизинами бактериофага. Канониче-

ские эндолизины – растворимые белки, которые могут преодолеть внутреннюю мембрану клетки только через образованные холинами крупные поры. Неканонические эндолизины имеют мембранный домен SAR («signal-arrest-release»), «закоряивающий» периплазматический фермент в мембране в неактивной форме и для его активации также требуется деполяризация мембраны, инициируемая холином [102].

Фагам грамотрицательных бактерий для завершения лизиса клетки хозяина необходимо слияние внутренней и наружной мембраны, которое обеспечивают спанины (от слова «span» – пронизывать) [91] (рис. 1б). Канонические спанины – парные белки, имеющие слабую аминокислотную и умеренную структурную гомологию [41].

Белок i-спанин, получивший название за связь с внутренней мембраной («inner» — внутренний), имеет N-концевой трансмембранный домен и C-концевой растворимый периплазматический домен, богатый α -спиралями. Белок o-spanin (от слова «outer» — наружный) — липопrotein, чей липоилированный N-конец погружен в наружную мембрану за счет остатков жирных кислот, а C-концевая часть также находится в периплазме [102]. На модели бактериофага λ установлено, что спанины взаимодействуют в периплазме C-концевыми доменами [3], при этом конформационные перестройки обоих белков индуцируют формирование активного гетеротетрамера. Комплекс спанинов, сокращаясь в периплазме, свободной от пептидогликана после его деструкции эндолизином, осуществляет слияние мембран [4, 5, 11, 75]. Встречаются мономолекулярные спанины: u-спанин бактериофага T1 совмещает функции обоих, наружного и внутреннего, спанинов [42].

Фагам микобактерий на пути из клетки-хозяина в окружающую среду приходится дополнительно преодолевать слой микотил-арабиногалактана, и поэтому они индуцируют не один, а два литических фермента, LysA и LysB. LysA является пептидогликангидролазой, тогда как эстераза LysB обладает липолитической активностью и расщепляет связь миколовых кислот с арабиногалактаном [33, 73] (рис. 1в).

Все литические белки бактериофагов потенциально антибактериальные агенты, альтернативные традиционным антибиотикам [77]. Наибольшее внимание исследователей привлекают эндолизин, как ферменты, деградирующие основную структурообразующий компонент клеточной стенки — пептидогликан.

ЭНДОЛИЗИНЫ, СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ

Эндолизин бактериофагов, инфицирующих грамположительные бактерии, обычно обладают модулярным строением и имеют один или несколько N-концевых каталитических доменов (КД) и один или несколько C-концевых доменов связывания с клеточной стенкой (СД) [80]. У модулярных эндолизинов СД определяет специфичность к типу клеточных стенок путем распознавания и нековалентного связывания с лигандом, расположенным на поверхности бактериальной клетки. Некоторые СД хорошо охарактеризованы структурно и функционально, например СД LysM, связывающий GLcNAc гликанового остова пептидогликана [97], СД Cpl-1, связывающий остатки холина, тейхоевых кислот [36], SH3b, связывающий пентаглицинового поперечные мостики пептидогликана стафилококков [99].

Взаимодействие между СД и лигандом характеризуется высоким сродством. Так, равновесная константа аффинности СД PlyP35 лежит в пико- и наномолярном диапазоне, что сопоставимо или даже превышает аффинность антитела к антигену [53]. Считается, что СД по окончании гидролиза удерживает эндолизин прочно связанным с остатками клеточной стенки бактерии-хозяина, предотвращая диффузию активного фермента и последующую деструкцию окружающих, еще не инфицированных фагом, клеток бактерий — потенциальных будущих хозяев для фаговых частиц потомства. Таким образом СД ограничивает процессивность фермента, имеющего модулярное строение.

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий предотвращает саму возможность разрушения эндолизином клеток потенциальных хозяев, ограничивая доступ к ПГ извне. Вероятно, именно поэтому эндолизин фагов грамотрицательных бактерий, как правило, небольшие глобулярные белки, представленные единственным доменом, совмещающим функции катализа и связывания субстрата. К настоящему времени нет экспериментальных данных о механизмах связывания однодоменными эндолизинами. В работе, исследующей связывание субстрата эндолизинами фагов грамотрицательной бактерии *Pseudomonas*, объекты исследования — KZ144 и EL188 — оказались ферментами с модулярной структурой, имеющими химерное происхождение. На N-конце этих белков расположен аналог СД эндолизинов фагов грамположительных бактерий, который отвечает за сродство к пептидогликану хемотипа A1 [8].

Пептидогликан бактерий — сложный гетерополимер; его гликановая часть состоит из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных между собой β -1,4-гликозидными связями [98]. К карбоксилу N-ацетилмуравовой кислоты может присоединяться амидной связью пептидный фрагмент, содержащий, помимо белковых L-аминокислот, неканонические аминокислоты (например, мезодиаминопимелиновую ДАП), а также D-аминокислоты. Такой состав защищает пептидогликан от гидролиза обычными пептидазами. Чаще всего пептидная субъединица содержит последовательность L-Ала-D-Глу-L-ДАП-D-Ала, однако, в отличие от полисахаридной составляющей, пептидной части свойственна вариативность, положенная в основу классификации пептидогликанов [79] (табл. 1).

Таблица 1. Классификация пептидогликанов по [79]**Table 1.** Peptidoglycan classification according to [79]

Тип Ветвление от-к (а.о в позиции 1)		Состав мостика (а.о.)	а.о. в позиции 3	Подтип пептидогли- кана
А 3→4 (L-Ала)		нет	L-Лиз	A1a
			L-Орн	A1b
			ДАП	A1γ
		D-Ала-L-Лиз-D-Глу-L-Ала	L-Лиз	A2
		Гли и моноамино-карбоновые	L-Лиз	A3a
			L-Орн	A3b
			ДАП	A3γ
		Дикарбоновые	L-Лиз	A4a
			L-Орн	A4b
			ДАП	A4γ
В 2→4 (L-Гли, L-Сер)		L-диаминокарбоновые	L-Лиз	B1a
			L-Hsr	B1b
			L-Глу	B1γ
			L-Ала	B1δ
		D-диаминокарбоновые	L-Орн	B1a
			L-Hsr	B1b
			L-Даб	B1γ

Вариабельность в основном касается аминокислоты в 3 положении пептидной субъединицы, а также типа ветвления и состава пептидных мостиков [79]. Пептидные мостики связывают гликановые цепи в единую сеть, формируя огромную макромолекулу, окружающую бактериальную клетку снаружи у грамположительных бактерий и находящуюся в периплазме у грамотрицательных.

По типу связи, разрываемой в пептидогликане, эндолизины делят на 5 групп, 4 из которых относятся к классу гидролаз: 1) лизоцимоподобные мурамидазы (КФ 3.2.1.17), которые гидролизуют гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином; 2) литические трансгликозилазы (лиазы, КФ 4.2.2.29), осуществляющие негидролитический разрыв этой же связи, сопровождаемый внутримолекулярным переносом O-мурамильного остатка на собственный C₆-гидроксил; 3) N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (КФ 3.2.1.52), гидролизующие гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой

кислотой; 4) N-ацетилмурамил-L-аланинамидазы (КФ 3.5.1.28), которые гидролизуют связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином пептидной субъединицы; 5) эндопептидазы (КФ 3.4.X.X) гидролизуют пептидную часть пептидогликана и делятся на подгруппы по специфичности [7, 31, 80]. Одной из подгрупп эндопептидаз являются L-аланоил-D-глутаматпептидазы, гидролизующие пептидную связь между остатками L-аланина и D-глутаминовой кислоты. Сведения об этих ферментах не систематизированы, а между тем L-Ала и D-Глу — две наиболее консервативные первые аминокислоты пептидной субъединицы пептидогликана типа А, который свойственен всем грамотрицательным и большинству грамположительных бактерий. Таким образом, связь L-Ала-D-Глу широко распространена, и потенциально L-аланоил-D-глутаматпептидазы — антибактериальные агенты широкого спектра действия. Настоящий обзор — первая попытка обобщить имеющиеся данные о пептидогликангидролазах этой группы.

L-АЛАНОИЛ-D-ГЛУТАМАТПЕПТИДАЗЫ (КФ 3.4.24.B24): ИСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРЕДСТАВИТЕЛИ

Впервые L-аланоил-D-глутаматпептидазная активность была обнаружена в 1976 г. при изучении фаговой инфекции бактерии рода *Pseudomonas*, но белок, отвечающий за эту активность, найден не был [100]. Развитие генной инженерии и возможности получать рекомбинантные белки предоставило исследователям преимущества, и в 1995 г. Мартину Лесснеру с соавт. впервые удалось соотнести L-аланоил-D-глутаматпептидазную активность с конкретным белком [55]. Эти исследователи обнаружили три рекомбинантных модулярных эндолизина различных бактериофагов, инфицирующих грамположительные бактерии рода *Listeria*, два из которых, Ply118 и Ply500, оказались L-аланоил-D-глутаматпептидазами. В 2009 г. был обнаружен первый однодоменный (обычно их называют глобулярными) эндолизин бактериофага T5, заражающего грамотрицательные палочки *E. coli* [62]. Этот фермент имел гомологию с каталитическими доменами Ply118 и Ply500 и был очищен до гомогенности, что позволило детально охарактеризовать его свойства. Ply118 и Ply500 вскоре также были очищены и охарактеризованы [83]. В настоящее время, благодаря росту количества секвенированных последовательностей и развитию методов биоинформатики, анализ баз данных программой Blast [14] обнаруживает большое число гомологов, источником которых являются геномы бактериофагов, профаги бактерий и метагеномные последовательности. Помимо уже упомянутых L-аланоил-D-глутаматпептидаз идентифицированы и биохимически охарактеризованы модулярный фермент фага *B. cereus* LysB4 [90] и глобулярные (однодоменные) эндолизины фагов грамотрицательных бактерий: инфицирующих *Escherichia* бактериофагов RB43, RB49 [60], заражающего *Pseudomonas* фага KP27 [59], инфицирующего *Aeromonas* фага 3 [61]. Помимо фаговых, охарактеризованы две однодоменные L-аланоил-D-глутаматпептидазы из геномов бактерий. ChiX грамотрицательной бактерии *Serratia marcescens* вместе с холинподобным белком ChiW опосредует секрецию хитинолитических ферментов [35]. Возможно, это пример адаптации к нуждам бактерии кластера литических фаговых генов. Систему секреции грамотрицательных бактерий с участием диады холин-лизин Палмер с соавт. предложили называть Type 10 Secretion System (TXSS) [70]. CwlK из генома *B. subtilis* отличается от других охарактеризованных L-аланоил-D-глутаматпептидаз наличием сигнального пептида: для транслокации через внутреннюю мембрану ей не нужен холин [28]. По-видимому, ее биологическая роль заключается в участии в метаболизме пептидогликана или делении бактерии. Для всех перечисленных ферментов определен сайт гидролиза в пепти-

догликане — связь L-Ала-D-Глу. Однодоменные пептидазы имеют молекулярные массы от 14.7 до 19.0 кДа, модулярные Ply118, Ply500 и LysB4 — 27.9–33.4 кДа. Степень гомологии между различными глобулярными L-аланоил-D-глутаматпептидазами или каталитическими доменами модулярных варьирует от 19 % (пара EndoT5/CwlK) до 87 % (пара EndoRB43/KP27) идентичности.

СТРУКТУРА И АКТИВНЫЙ ЦЕНТР

Анализ последовательностей позволяет отнести рассматриваемые L-аланоил-D-глутаматпептидазы к суперсемейству цинксодержащих пептидаз M15, подсемейству C по классификации Роулингса [76] (база данных MEROPS <https://www.ebi.ac.uk/merops/index.shtml>). В активном центре этих пептидаз находится ион цинка, координированный двумя остатками Гис и одним Асп, и каталитическим остатком является еще один аспарат. Характерные черты последовательностей можно видеть на множественном выравнивании, выполненном для десяти биохимически охарактеризованных белков или их каталитических доменов (рис. 2). Сходство вторичной структуры, также представленной на рис. 2, показывает, что ферменты подсемейства M15_C имеют не только аминокислотную, но и выраженную структурную гомологию.

В Protein Data Bank депонированы несколько структур L-аланоил-D-глутаматпептидаз. Две структуры эндолизина фага T5 решены методом ЯМР в растворе: одноионная EndoT5Zn²⁺ (PDB ID 2MZK, [74]) и двухионная форма EndoT5Zn²⁺Ca²⁺ (PDB ID 8P3A, [63]). Остальные структуры установлены методом рентгеноструктурного анализа. Среди них пептидогликангидролаза ChiX грамотрицательной бактерии *Serratia marcescens* (PDB ID 5OPZ и 5OQ1, [69]), каталитический домен LysB4, эндолизина бактериофага B4, заражающего *Bacillus cereus* (PDB ID 6AKV, [37]) и каталитический домен эндолизина Ply500 фага бактерий рода *Listeria* (PDB ID 2VO9, [43]). Это мономерные белки (димеризацию ChiX при кристаллизации сами авторы относят к артефактам), в центре глобул которых расположены 3–4 антипараллельные β-складки, окруженные 4–5 α-спиралями. Каталитический ион цинка координирован триадой Н-D-Н (отмечены на рис. 2 черными звездочками), четвертым лигандом является молекула воды. Подобная укладка характерна для широкой группы пептидаз различной специфичности, к которой относятся представители не только всего семейства M15 (включая D-Ала-D-Ала-пептидазы подсемейств A, B и D), но и семейства M23 (например, гидролизующий пентаглицинового мостика лизоафин), а также семейства C46 (SHN-белки). Всю обширную группу было предложено называть LAS-пептидазами [6]. Отличительной чертой L-аланоил-D-глутаматпептидаз является каталитический аспарат, непосредственно участвующий

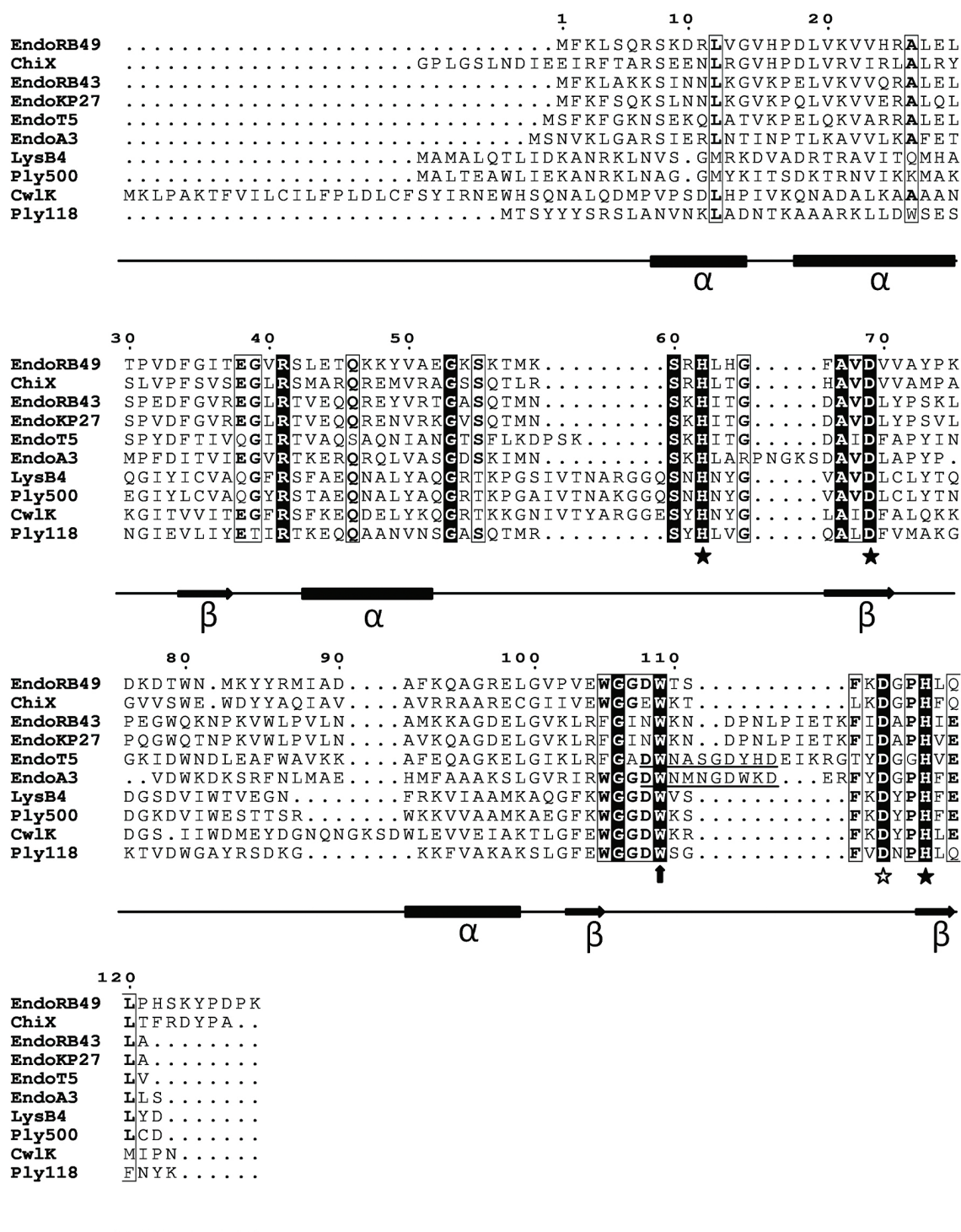


Рис. 2. Множественное выравнивание последовательностей L-аланоил-D-глутаматпептидаз EndoT5, EndoA3, EndoRB43, EndoRB49, K27, CwlK, ChiX и каталитических доменов Ply118, Ply500 и LysB4. Черными звездами отмечены остатки, координирующие Zn^{2+} , белой — каталитический Асп, стрелкой — инвариантный Три. Подчеркнута последовательность кальцийсвязывающей петли EndoT5 и EndoA3. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнено программой Clustal W [94]. Консенсусные последовательности найдены с помощью ESPript 3.0 [78]. Для предсказания вторичной структуры использована программа Jpred 4 [24]

Fig. 2. Multiple sequence alignment of L-alanoyl-D-glutamate peptidases EndoT5, EndoA3, EndoRB43, EndoRB49, K27, CwlK, ChiX and catalytic domains of Ply118, Ply500 and LysB4. Black stars indicate residues coordinating Zn^{2+} , white stars indicate catalytic Asp, and arrows indicate invariant Trp. The sequence of the calcium-binding loop of EndoT5 and EndoA3 is underlined. Multiple alignment of amino acid sequences was performed using Clustal W [94]. Consensus sequences were found using ESPript 3.0 [78]. Jpred 4 [24] was used for secondary structure prediction

в нуклеофильном замещении при гидролизе пептидной связи (отмечен на рис. 2 белой звездочкой). В двух независимых исследованиях показано, что его точечная замена приводит к полной потере активности [44, 69]. Расположенный вблизи активного центра в неструктурированной области триптофан (на рис. 2 отмечен стрелкой) также инвариантен у всех пептидаз подсемейства M15_C. Этот остаток во всех решенных структурах соседствует с каталитическим Асп и экспонирован в раствор. Сайт-направленный мутагенез W114/109 двух ферментов — EndoT5 и EndoRB49 — показал, что этот остаток Трп влияет на формирование их каталитически активных форм и критически важен для катализа [63]. Интересно, что у EndoT5 W114 находится в основании подвижной петли, связывающей регуляторный ион кальция [44]. Было показано, что остаток W114 опосредует активацию фермента Ca^{2+} , фиксируя регуляторную петлю и обеспечивая формирование каталитически активной «открытой» конформации белковой глобулы [48, 63].

Подсемейство цинксодежащих пептидаз M15_C насчитывает более 850 потенциальных членов в базе данных MEROPS. Таким образом, структурно-функциональные взаимосвязи, обнаруженные для отдельных белков, можно экстраполировать на большую группу прокариотических пептидогликангидролаз.

СУБСТРАТНАЯ И БАКТЕРИОСПЕЦИФИЧНОСТЬ

Описывая пептидогликандеградирующие ферменты, следует различать субстратную и бактериоспецифичность. Под первой понимают специфичность к гидролизующей пептидной связи, под второй — сродство фермента к клеточной стенке бактерий как целому.

Для установления сайта гидролиза L-аланоил-D-глутаматпептидаз в ряде работ использовали совокупность химических методов: защитив свободные аминокислоты ПГ ацетилированием, осуществляли динитрофенилирование продуктов ферментативного гидролиза ПГ с дальнейшей экстракцией и определением динитрофенилированного производного (N-концевой аминокислоты, в данном случае D-Глу), с одной стороны, и анализом изменения аминокислотного состава негидролизированных пептидов, с другой [55, 60, 62]. Альтернативным путем являлось разделение продуктов ферментативного гидролиза пептидогликана посредством ВЭЖХ с дальнейшим анализом муропептидов с помощью масс-спектрологии [28, 59, 69, 90]. Наконец, недавно для определения сайта гидролиза был впервые использован миметик пептидогликана — дисахаридтетрапептид, продукты гидролиза которого пептидазой EndoA3 анализировали с помощью гомо- и гетероядерных корреляционных ЯМР-спектров [61]. Все рассма-

триваемые ферменты специфически гидролизуют связь L-Ала-D-Глу.

Бактериоспецифичность модулярных пептидаз Ply118, Ply500 и LysB4 определяет связывающий домен (СД). Как правило, модулярные эндолизины родоспецифичны, но встречаются ферменты, нацеленные на единственный вид бактерии или даже серовар. К Ply118 и Ply500 были чувствительны 64 штамма 6 видов листерий, относящихся к 16 сероварам, а среди 37 бактерий других видов — только 3 вида рода *Bacillus* [55]. К LysB4 фага *Bacillus cereus* также, помимо бацилл, чувствительны два вида листерий [90], несмотря на различия типов СД у этих белков: SH3_5 у LysB4, PSA_CBD у Ply500 и DUF5776 у Ply118. Домен PSA_CBD связывается с N-ацетилглюкозамином, присоединенным к рибитолфосфату тейхоевых кислот клеточных стенок листерий. Однако, тейхоевые кислоты ингибируют связывание DUF5776, взаимодействующего, по-видимому, с пептидогликаном клеточной стенки [27]. Интересно, что рекомбинация доменов PSA_CBD и DUF5776 обеспечивала гибридным белкам расширенные распознающие и связывающие свойства по отношению к большинству штаммов листерий, а дупликация PSA_CBD увеличила аффинность связывания с клеточной стенкой примерно в 50 раз [82]. Это пример модульной инженерии литических белков, широко используемой для оптимизации их свойств. Известны успешные изменения родоспецифичности литических ферментов путем замены связывающего домена [2, 86].

Глобулярные представители L-аланоил-D-глутаматпептидаз совмещают в одном домене функции катализа и связывания субстрата. Можно предполагать, что их бактериоспецифичность будет ограничена лишь типом строения и доступностью ПГ, у грамотрицательных бактерий защищенного наружной мембраной. Действительно, однодоменные глобулярные пептидазы фагов T5, K27, RB43, RB49 после предварительной пермеабиллизации наружной мембраны эффективно лизировали все протестированные грамотрицательные бактерии родов *Eshcherichia*, *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, пусть и с разной скоростью [59, 61, 62, 84]. Следует отметить, что у всех грамотрицательных бактерий пептидогликан одинакового типа A1γ. Работа Шадрина с соавт. [84], посвященная анализу связи строения пептидогликана с подверженностью бактерий лизису EndoT5, EndoRB43 и EndoRB49, показала, что среди грамположительных бактерий с пептидогликаном типов A1α, A1γ, A2, A3α, A3γ, A4α, A4β, A4γ, B2γ существенную чувствительность к исследуемым пептидогликангидролазам проявляли только бациллы видов *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*. Не проявлял чувствительности *B. cereus*, чей пептидогликан ремоделирован в S-слои, укрепленные вторичными полисахаридами клеточной стенки [56, 92]. ПГ бацилл, так же, как и

ПГ листерий, относится к типу A1γ — это наиболее распространенный вариант с ДАП в 3 положении и отсутствием аминокислот в поперечных мостиках (табл. 1). Таким образом, несмотря на неполноту информации о бактериоспецифичности всех L-аланоил-D-глутаматпептидаз, можно предположить, что пептидогликан типа A1γ — наилучший субстрат для этих ферментов.

Стоит отметить, что модулярный эндолизин LysB4 также гидролизировал ПГ грамотрицательных бактерий: после предварительной пермеабиллизации наружной мембраны с помощью EDTA он эффективно лизировал бактерии родов *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Shigella*. Таким образом, СД модулярных эндолизинов ограничивает фагу спектр грамположительных хозяев, но не препятствует гидролизу субстрата, пептидогликана типа A1γ [90].

Что касается связывания субстрата однодоменными эндолизинами и каталитическими доменами модулярных эндолизинов, есть основания предполагать участие в нем экспонированных на поверхность и расположенных по соседству с активным центром остатков триптофана. Впервые предположение об участии Trp в гидрофобных взаимодействиях с гликановой частью субстрата было выдвинуто в работе Оуэна с соавт. [69]. Недавно было показано экспериментально, что неактивный мутант по консервативному триптофану EndoT5W114A, в отличие от неактивного мутанта этого же белка по каталитическому аспартату EndoT5D130A, не способен конкурировать за субстрат с нативным ферментом [63]. Таким образом, участие этого остатка триптофана в связывании субстрата более чем вероятно.

ПОЛУЧЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Для получения L-аланоил-D-глутаматпептидаз все авторы использовали технологии рекомбинантных ДНК. Рекомбинантные EndoT5, EndoA3, EndoRB43 и EndoRB49 имели природные последовательности без модификаций. Очистку до гомогенности осуществляли путем последовательных хроматографий на ионообменных носителях [60–62]. Для получения ChiX использовали GST-метку, в процессе очистки на глутатионсефарозе отщепляемую пептидазой [69]. При продукции Ply118, Ply500, CwlK, LysB4 и K27 авторы использовали 6xHis-метку [28, 55, 59, 90]; после очистки с помощью металлохелатной хроматографии она остается ковалентно связанной с белком. Однако путем сравнительного анализа свойств EndoT5 и EndoT5-6H было показано, что положительно заряженный шестигистиридиновый «довесок» не влиял на активность фермента, хотя несколько уменьшал стабильность препарата, повышая агрегацию [46].

Общим для всех ферментов является рН-оптимум: в большинстве случаев, когда его определяли, он лежал в области 8.0–10.0 [60–62, 83, 90] (табл. 2). Эти значения близки изоэлектрическим точкам рассматриваемых L-аланоил-D-глутаматпептидаз, которые являются щелочными белками с рК от 8.1 (EndoT5) до 9.85 (Ply118). Исключение представляет CwlK (рК=6.1) с оптимумом рН=6.5 [28]. Можно предположить, что каталитически активной формой ферментов является максимально развернутая «открытая» конформация, достигаемая в условиях наименьшего общего заряда. Эндолизины KP27 и LysB4 стабильны в широком диапазоне значений рН (2.0–10.5) [59, 90], EndoT5 также стабилен в кислых условиях при рН=4.2 [69].

Для большинства ферментов показана повышенная устойчивость к температуре, в частности, Ply118 сохраняет около 40% активности после 5-минутного прогрева при 90°C, и только через 30 мин она падает до 10% [83]. Предполагали, что структуру Ply118 стабилизируют дисульфидные связи между остатками цистеина. Однако ни одного остатка Цис нет в молекулах K27, EndoT5, EndoRB43 и EndoRB49, которые также устойчивы к нагреву [59, 60, 85]. При этом содержащий 4 остатка Цис Ply500 является термостабильным белком, как и лишенный цистеинов EndoA3 (оба инактивируются через 5 минут при 60°C) [61, 83]. Интересно, что LysB4 не просто устойчив к нагреву, его температурный оптимум активности составляет 50°C [90]. Показано, что в основе температурной устойчивости EndoT5, EndoRB43 и EndoRB49 лежит способность восстанавливать вторичную структуру белковой глобулы после частичной денатурации и последующего охлаждения [60, 85]. Она особенно выражена у EndoRB43, ренатурирующего 96% вторичной структуры после 10 мин при 90°C (для EndoT5 и EndoRB49 эти показатели составляют 80% и 77%, соответственно). При этом термостабильными данные ферменты не являются. К примеру, температура плавления EndoT5 составляет 56°C [85]. В работе Кутышенко с соавт. [49] показано, что остаточная структура сохраняется у EndoT5 даже после денатурации в 8М мочеvine или 6М гуанидингидрохлориде. Предположительно, участок α-спирали, образованный остатками 81–93, служит стабильной основой для формирования гидрофобного ядра, а затем и всей белковой глобулы.

Оптимум ионной силы, оцениваемый при различных концентрациях соли (NaCl) или буфера (Tris-HCl), варьируется. Так, для Ply118 и Ply500 оптимальная концентрация соли составляла 200–300 мМ [83], а для LysB4 — 25 мМ [90]. EndoRB43, EndoA3 и EndoT5 наиболее активны в буфере низкой ионной силы (25–50 мМ), EndoRB49 — средней (оптимум 100 мМ) [60–62] (табл. 2).

Таблица 2. Некоторые свойства L-аланоил-D-глутаматпептидаз
Table 2. Some properties of L-alanoyl-D-glutamate peptidases

Название фермента	Источник	Модулярное строение	Молекулярная масса, кДа	pK	Оптимум pH	Оптимум ионной силы, mM	Температурная устойчивость
EndoRB49	фаг RB49 <i>Escherichia</i>	-	14.75	9.52	7.5–8.5	100	+
EndoRB43	фаг RB43 <i>Escherichia</i>	-	14.80	9.48	7.5–8.5	25–50	+
EndoKP27	фаг KP27 <i>Klebsiella</i>	-	14.73	9.64			+
EndoT5	фаг T5 <i>Escherichia</i>	-	15.26	8.10	7.5–8.5	25–50	+
EndoA3	фаг A3 <i>Aeromonas</i>	-	15.35	9.48	8.5–9.5	25–50	-
LysB4	фаг B4 <i>Bacillus cereus</i>	+	27.88	9.20	8.0–10.0	25	+
Ply118	фаг A118 <i>Listeria</i>	+	30.80	9.85	8.0–10.0	200–300	+
Ply500	фаг A500 <i>Listeria</i>	+	33.42	9.52	8.0–10.0	200–300	–
CwlK	<i>Bacillus subtilis</i>	сигнальный пептид	19.07	6.10	6.5	50	
ChlX	<i>Serratia marcescens</i>	-	15.46	8.98			

Таблица 2. (Продолжение)
Table 2. (Continued)

Название фермента	Активаторы	Ингибиторы	Бактерии, подверженные лизису	Структура PDB ID	Ссылки из списка литературы
EndoRB49		1 mM Zn ²⁺ , K-Pi	<i>Eshcherichia</i> *, <i>Pseudomonas</i> *, <i>Cellulomonas</i> , <i>Sporosarcina</i> , <i>Bacillus</i>	23RI	[60, 84]
EndoRB43		1 mM Zn ²⁺ , K-Pi		-	[60, 84]
EndoKP27			<i>Pseudomonas</i> *, <i>Eshcherichia</i> *, <i>Salmonella</i> *, <i>Klebsiella</i> *	-	[59]
EndoT5	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	K-Pi; 1 mM Zn ²⁺ , EDTA, EGTA, BAPTA	<i>Eshcherichia</i> *, <i>Pseudomonas</i> *, <i>Pectobacterium</i> *, <i>Proteus</i> *	2MZX, 8P3A	[62, 63, 74]
EndoA3	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	K-Pi; 1 mM Zn ²⁺ , EDTA, EGTA, BAPTA	<i>Acinetobacter</i> *, <i>Agrobacterium</i> *, <i>Escherichia</i> *, <i>Pseudomonas</i> *, <i>Pectobacterium</i> *, <i>Bacillus</i>	-	[61]
LysB4		5 mM EDTA	<i>Bacillus</i> ; <i>Listeria</i> ; <i>Escherichia</i> *, <i>Pseudomonas</i> *, <i>Cronobacter</i> *, <i>Salmonella</i> *, <i>Shigella</i> *	6AKV	[37, 90]
Ply118	Mn ²⁺	250 mM EDTA	<i>Listeria</i> ; <i>Bacillus</i>	-	[55, 83]
Ply500				2VO9	[43, 55, 83]
CwlK				-	[28]
ChiX				5OPZ, 5OQ1	[35, 69]

*Грамотрицательные бактерии с предварительно пермеабильизованной наружной мембраной

* Gram-negative bacteria with a pre-permeabilized outer membrane

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ, АКТИВАТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ

Количественно литическую активность пептидогликандеградирующих ферментов оценивают по максимальной скорости убывания оптической плотности суспензии бактериальных клеток [87]. Антибактериальную активность определяют по убыли числа колониеобразующих единиц (КОЕ), и она часто не коррелирует с литической [67]. Измерение литической активности на клетках грамположительных бактерий ведут непосредственно, клетки грамотрицательных требуют предварительной пермеабилзации их наружной мембраны либо хлороформом [13], либо, например, EDTA [90]. Предварительная пермеабилзация грамотрицательных клеток не требуется для пептидогликандеградирующих ферментов с собственной мембранной активностью, в частности, обладающих положительно заряженным доменом, подобным антимикробному пептиду [50]. Среди L-аланоил-D-глутаматпептидаз таких ферментов нет. Сравнение абсолютных значений удельной активности, полученных разными авторами, затруднено тем, что измерения ведут при разной длине волны (от 450 до 600 нм), а также тем, что за единицу активности принимают количество фермента, обеспечивающее убыль оптической плотности суспензии на 1 Е/мин [60–62], на 0.01 Е/мин [83] или на 0.001 Е/мин [59]. Скорости лизиса грамположительных бактерий, имеющих многослойный пептидогликан толщиной до 50 нм, и грамотрицательных с 1–2 нм тонким слоем, объективно различны. По перечисленным причинам при оценке влияния активаторов и ингибиторов на разные ферменты корректнее сравнивать не абсолютные, а относительные значения активности. Однако можно отметить, что наибольшей удельной активностью из исследованных пептидаз обладает EndoRB43 — 20555.1 ± 112.7 Е/мг белка (1 Е = $10E_{450}$ /мин) [60].

Определяющее значение для активации и ингибирования имеет каталитический ион цинка в активном центре L-аланоил-D-глутаматпептидаз. Инкубирование Ply118 и Ply500 в 250 мМ EDTA приводило к частичной или полной инактивации [83]. Добавление избытка двухвалентных ионов Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} к отмытым от хелатора ферментным препаратам Ply118 и Ply500 частично или полностью восстанавливало их активность [83]. Для Ply118 Mn^{2+} в концентрации 1 мМ являлся активатором, вызывая 2.4-кратное увеличение активности по сравнению с контролем. LysB4 также инактивировала инкубация в 5 мМ EDTA [90]. Интересно, что ионы Zn^{2+} в концентрации 1 мМ не восстанавливали активность Ply118 и Ply500 после обработки EDTA [83], но в концентрации 0.1 мМ полностью реактивировали LysB4 [90]. При этом ионы Mn^{2+} , Mg^{2+} и Ca^{2+} в концентрации 0.1 мМ

восстанавливали активность LysB4 лишь частично; для 90%-ного восстановления требовалась 1 мМ концентрация [90]. Ионы Zn^{2+} в концентрации 1 мМ полностью инактивировали EndoT5, EndoA3, EndoRB43 и EndoRB49 без предварительной обработки хелатором [60–62]. Специфическое ингибирование избытком цинка характерно для цинксодержащих пептидаз; механизм подобного ингибирования рассмотрен на примере карбоксипептидазы А [51]. Хелаторы широкого спектра EDTA, EGTA и кальциевый хелатор BAPTA в концентрации 0.1–1.0 мМ ингибировали EndoT5 и EndoA3 [61, 62], которые, помимо каталитического цинка, связывают регуляторный кальций, но не влияли на активность EndoRB43 и EndoRB49 [60]. Хелатор цинка фенантролин в концентрации 1 мМ не оказывал существенного влияния на активность этих четырех пептидаз. Ион цинка в активном центре прочно связан, и требуется значение pH ниже 4.0 для его диссоциации [46]. Активность EndoT5 и EndoA3 после ингибирования EDTA, EGTA и BAPTA полностью восстанавливалась добавлением ионов Ca^{2+} или Mn^{2+} в концентрации, превышающей концентрацию хелатора [61, 62].

Инактивирующим действием на EndoT5, EndoA3, EndoRB43 и EndoRB49 обладал фосфатный буфер [60–62]; одной из возможных причин этого является плохая растворимость фосфатов каталитического цинка. Именно использованием в работе, характеризующей эндолизин KP27 [59], фосфатного буфера в качестве реакционного можно объяснить сравнительно низкую активность этого фермента — в 200–1000 раз ниже, чем у ортологичных глобулярных эндолизинов EndoT5, EndoA3, EndoRB43 и EndoRB49.

Активность EndoT5, EndoA3, EndoRB43 и EndoRB49 в присутствии 0.1%-ного Тритона X-100 повышалась в 1.5–5 раз [60–62]. Вероятно, этот мягкий неионный детергент делает более доступными ферменту гидролизуемые связи в пептидогликане пермеабилзованных клеток. Ранее было показано, что в отсутствие Тритона X-100 активность эндолизина фага ф6 на пермеабилзованных целых клетках бактерий падает на два порядка, сохраняя при этом на очищенных клеточных стенках 85% от максимальной [13].

КАЛЬЦИЙ КАК СТРУКТУРНЫЙ РЕГУЛЯТОР

Среди охарактеризованных L-аланоил-D-глутаматпептидаз две — EndoT5 и EndoA3 — помимо каталитического иона цинка, связывают регуляторный кальций [61, 62]. Это ферменты неродственных фагов теквинтавируса T5 (хозяин *E. coli*) и неклассифицированного хвостатого фага 3 (хозяин *Aeromonas sp.*). Сайт-направленный мутагенез EndoT5 [44] и сравнение одно- и двухионной структур (PDB ID: 2MZX, PDB ID: 8P3A) [74] выявили неканонический аналог кальцийсвязыва-

ющей EF-петли вида GxDWN/DxxGx{3,4}D/E, образованный остатками 113–123 (рис. 3). Подобная подвижная петля имеется и у EndoA3 [61]. Было показано, что ион кальция выступает в роли структурного регулятора: связывание Ca^{2+} фиксирует подвижную петлю, приводя активный центр с каталитическим цинком в «открытую» конформацию [48]. Для формирования каталитически активной глобулы необходимы как Zn^{2+} , так и Ca^{2+} [61].

Функционально EF-подобная петля аналогична канонической последовательности EF-мотива эукариотических кальцийсвязывающих белков, первые шесть позиций которого имеют консенсус DxDxDG с инвариантным глицином в 6 положении [23, 32] (рис. 3A). Однако, классические EF-белки отличаются высоким сродством к иону Ca^{2+} . Для четырех EF-петель кальциевого «сенсора» кальмодулина значения констант диссоциации (Кд) варьируют в диапазоне $(0.5–10) \cdot 10^{-6}$ М [34]. Для так называемых кальциевых «буферов» сродство еще выше: так, для парвальбумина Кд в зависимости от тем-

пературы меняется в диапазоне $(1.8–11) \cdot 10^{-9}$ М [26]. Сродство EndoT5 и EndoA3 к Ca^{2+} существенно ниже: константы диссоциации составляют $2 \cdot 10^{-4}$ М и $1.4 \cdot 10^{-4}$ М, соответственно [61, 62]. Причина низкого сродства EndoT5 и EndoA3 к кальцию кроется в том, что сходство их петель с каноническим EF-мотивом не более чем конвергентное. В классической EF-петле ион Ca^{2+} прочно связан 6 лигандами в позициях 1, 3, 5, 7, 9 и 12, образующими 7 координационных связей, организованных в пентагональную бипирамиду [40]. Регуляторная петля EndoT5-типа имеет укороченный размер и замены в С-концевой области; вместо двух консервативных α -спиралей, «входящей» и «исходящей», имеет «входящую» β -складку (рис. 3Б). Анализ двухионной структуры PDB ID 8P3A показывает, что координационных связей с кальцием образуется всего 3. Поскольку в петле только четыре ключевых позиции (Асп-1, полярные аминокислоты в положениях 3 и 5, а также «поворотный» Гли-6), достаточно двух-трех мутаций для формирования способности координировать кальций.

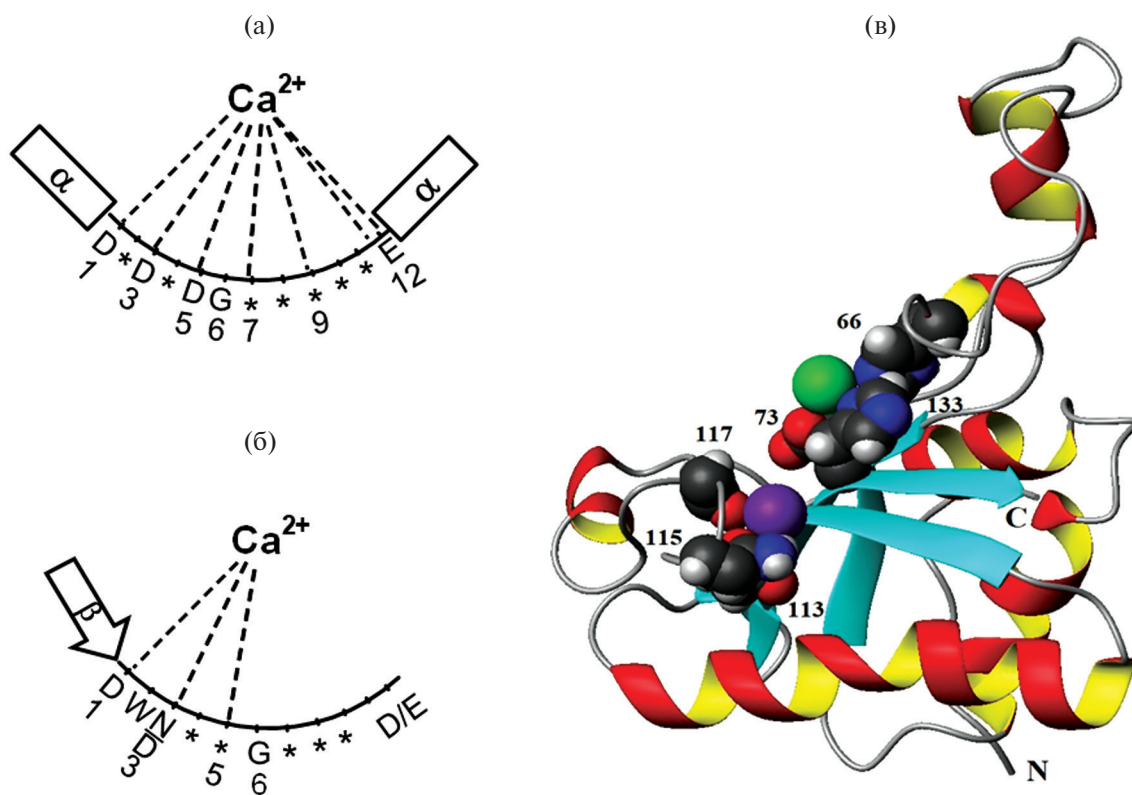


Рис. 3. Схемы связывания кальция канонической EF-петлей (а), EF-подобной петлей (б), эндолизинем EndoT5 (PDB ID 8P3A) (в). Регуляторный Ca^{2+} (фиолетовая сфера) и каталитический Zn^{2+} (зеленая сфера) отмечены в структуре. Цифрами указаны порядковые номера а.о., участвующих в связывании ионов

Fig. 3. Calcium binding patterns of the canonical EF-loop (a), the EF-like loop (б), and EndoT5 endolysin (PDB ID 8P3A) (в). Regulatory Ca^{2+} (purple sphere) and catalytic Zn^{2+} (green sphere) are indicated in the structure. The numbers indicate the residue numbers involved in ion binding

Конформационные перестройки, вызываемые Ca^{2+} в молекуле эндолизина, аналогичны работе кальциевых «сенсоров»: связывание ими Ca^{2+} также влечет внутримолекулярные изменения, экспонирующие на поверхность «сенсора» гидрофобные участки белковой глобулы, взаимодействующие затем с другими белками [38]. Подобный механизм характерен, например, для Ca^{2+} -кальмодулина [58]. Таким путем ионы кальция опосредуют передачу сигналов в клетках, преимущественно эукариотических. В случае эндолизинов, очевидно, Ca^{2+} обеспечивает не сигнальную, а ферментативную функцию белка.

Поиск белков, потенциально также обладающих кальциевой регуляцией, проведенный среди представителей таксона Viruses на основе вырожденной кальцийсвязывающей петли GxDWN/DxxGx{3,4}D/E, выявил 71 уникальную последовательность [61]. Все они представляют собой потенциальные L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофагов, инфицирующих грамотрицательные бактерии, преимущественно энтеробактерии родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pectobacterium*, *Shigella*, но также *Aeromonas*, *Acinetobacter* и др. Анализ положения кальций-зависимых ферментов на общем дереве 254 глобулярных L-аланоил-D-глутаматпептидаз [61] позволяет предположить, что кальцийсвязывающая петля возникла независимо у, по крайней мере, двух неродственных таксономических групп фагов, а затем распространялась внутри этих групп с помощью горизонтального переноса генов, играющего большую роль в эволюции фаговых геномов [22].

В цитоплазме грамотрицательного хозяина, где происходит синтез литических белков фага, концентрация Ca^{2+} не превышает 700 нМ [30], но его периплазма является кальциевым «депо» [39]. Низкое сродство EF-подобных петель к регуляторному Ca^{2+} указывает, что связывание иона происходит именно в периплазме, куда фермент попадает после образования холиновых пор и где находится его субстрат. Такая активация имеет очевидный биологический смысл, предохраняя клетки как от преждевременного лизиса, так и от внутриклеточного протеолиза. Известно, что скорость молекулярной эволюции, основанной на возникновении мутаций, в условиях коэволюции в популяциях фаг-бактерия вдвое выше, чем у фагов, эволюционирующих против фиксированного бактериального генотипа [10]. Таким образом, посттрансляционная активация эндолизина периплазматическим кальцием как дополнительный уровень регуляции фаголизиса — пример совместной эволюции бактериофагов и их грамотрицательных хозяев.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Повышенный интерес к эндолизинам вообще и L-аланоил-D-глутаматпептидазам в частности связан прежде всего с их бактерицидными свойствами: эти ферменты способны при применении извне деградировать пептидогликан, основной структурообразующий компонент клеточной стенки бактерий, в результате чего те гибнут под действием осмотического лизиса. По отношению к эндолизинам в 2001 г. был введен термин «энзимобиотики» [66]. Преимущества эндолизинов по сравнению с терапией целыми фаговыми частицами заключаются в низкой иммуногенности, отсутствии генетической трансдукции, низкой вероятности выработки устойчивости, а по сравнению с антимикробными пептидами — в относительно высокой бактериоспецифичности, отсутствии цитотоксичности, простоте получения рекомбинантных белков [7, 21, 25, 64, 65]. Среди других преимуществ пептидогликандеградирующих ферментов можно назвать высокую активность, способность лизировать антибиотикорезистентные штаммы, способность действовать синергически с другими агентами [57, 84]. Кроме того, у эндолизинов часто встречается устойчивость к повышенной температуре (это характерно и для большинства L-аланоил-D-глутаматпептидаз), а конформационная стабильность очень важна для фармацевтических препаратов. В последние годы создан целый ряд моделей для лечения животных от инфекций на основе пептидогликангидролаз, в основном на крысах и мышах [16, 72, 81]. Для рассматриваемых L-аланоил-D-глутаматпептидаз также описаны успешные эксперименты *in vitro*.

Так, ген L-аланоил-D-глутаматпептидазы Ply118 фага листерий был успешно клонирован в *Lactococcus lactis* с целью защиты производства сыра от загрязнений листериями [29]. Однако, получить секретируемый в среду фермент авторам не удалось, а активности цитоплазматического фермента, зависящей от уровня естественного лизиса лактококков, оказалось недостаточно для полного контроля. Этот же ген вместе с геном своего холина был использован для получения суицидного штамма *Listeria monocytogenes* rsΔ2, который ограничивал собственный рост автолизом за счет активности Ply118 [45]. Полученный штамм оказался способен доставлять посредством челночного вектора белки и ДНК в монослой делящихся эпителиальных клеток человека Caco-2. Авторы предполагали его использование для оральной вакцинации [45]. Другая L-аланоил-D-глутаматпептидаза фага листерий, Ply500, иммобилизованная на кремниевых наночастицах в составе тонкой полигидроксипропиламидной пленки либо аффинно связанная со съедобными сшитыми наночастицами крахмала в составе химерного белка, показала

свою эффективность в уничтожении *L. innocua* [88]. Авторы работы прогнозировали применение разработанных наночастиц для высокоселективной и эффективной элиминации этих пищевых патогенов [88]. LysB4, L-аланоил-D-глутаматпептидаза фага *B. cereus* проявляла бактериолитическую активность против всех бактерий рода *Bacillus*, включая ряд штаммов возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*, и предотвращала гибель мышей A/J после заражения спорами *B. anthracis* Sterne [71]. Широко используются в нацеливании ферментов на нужные штаммы технологии белковой инженерии. Например, слияние посредством спирального линкера каталитического домена LysB4 фага *B. cereus* с эндолизинном фага SA11, инфицирующего *S. aureus*, привело к расширению бактериоспецифичности: химерный белок лизировал обе бактерии [89].

Эндолизины эффективно действуют извне прежде всего на грамположительные бактерии, поскольку их слой пептидогликана лишен дополнительной барьерной защиты в виде наружной мембраны. Однако, разработан ряд подходов, позволяющих лизировать грамотрицательные микроорганизмы. Гидролиз ферментами при этом опосредуется пермеабиллизацией наружной мембраны катионными агентами, детергентами, слабыми кислотами или антимикробными пептидами [1, 9, 68].

Эндолизин бактериофага T5 EndoT5 лизировал интактные клетки *E. coli* в присутствии целого ряда катионных агентов, пермеабиллизующих мембрану, среди которых самым эффективным являлся хлоргексидин в концентрации 0.5 мкг/мл: число КОЕ падало на 6.6 порядков [85]. Мутант этого фермента EndoT5E123A, устойчивый к металлохелаторам, был активен на живых клетках *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 в присутствии 250 мкМ EDTA [44]. L-аланоил-D-глутаматпептидазы бактериофагов RB43 и RB49 на 4-7 порядков уменьшали число КОЕ бактерий трех штаммов рода *Pseudomonas* (в том числе мультирезистентного) в 100 мМ Tris-HCl буфере, содержащем 125 мкМ EDTA. В [84] работе было продемонстрировано синергическое действие ферментов с компонентами буфера. L-аланоил-D-глутаматпептидаза бактериофага KP27 лизировала живые клетки псевдомонад в присутствии дендримеров на основе полипропиленimina, причем эффективность этих катионных агентов зависела от их заряда и модификации мальтозой [19], а также в присутствии ПЭГилованных карбосилановых наночастиц серебра [20].

Для нацеливания на клетки грамотрицательных бактерий также используются методы белковой инженерии. В частности, L-аланоил-D-глутаматпептидаза бактериофага T5 была применена для создания так называемых иннолизиннов — химерных рекомбинантных белков, антибактериальная активность которых опосредуется

рецепторсвязывающими фаговыми белками. Как результат, иннолизин, в котором эндолизин T5 был посредством линкера соединен с фрагментом белка Pb5, связывающего рецептор FhuA, оказался способен снижать численность *E. coli*, *Shigella sonnei* и *Pseudomonas aeruginosa* [105]. В другом варианте данную пептидазу удалось нацелить на пищевой патоген *Campylobacter jejuni*, использовав Н-волокну профага CJIE1, функционирующее как рецепторсвязывающий белок; полученный иннолизин снижал титр патогена более чем на порядок [104].

К сожалению, между лабораторными разработками, направленными на терапевтические цели, и сертифицированным лекарственным препаратом лежит «дистанция огромного размера». Главными препятствиями на пути терапевтического применения эндолизиннов являются верификация биобезопасности этих белков, а также проблемы доставки к месту воздействия в организме [65]. В частности, эндолизины идеальны для наружного применения, но в силу белковой природы разрушаются при пероральном приеме, а назальное применение требует защиты от иммунной системы хозяина. Исследования фармакокинетики и фармакодинамики потенциальных антибактериальных препаратов, а также разработка средств нацеливания на нужную мишень на основе наноматериалов помогут это преодолеть. Приходится учитывать при разработке новых лекарств регламенты и ограничения Европейского медицинского агентства, особенно строгие для рекомбинантных или генно-модифицированных белков (чуть меньше этих ограничений для ветеринарных препаратов) [65]. Перечисленных проблем лишено нетерапевтическое применение эндолизиннов, возможности которого исследователи часто недооценивают.

Между тем, эти ферменты могут быть использованы для решения ряда биотехнологических задач. Например, специфичность к пептидогликану листерий рекомбинантной модулярной L-аланоил-D-глутаматпептидазы Ply118 позволила применить ее в качестве инструмента для быстрой экстракции ДНК, РНК и белков из клеток листерий с высоким выходом [54]. Более широкая специфичность глобулярных эндолизиннов колифагов RB43 и RB49, активных на живых клетках ряда бацилл, позволила разработать эффективный метод выделения геномной ДНК, основанный на синергическом действии на клеточную стенку L-аланоил-D-глутаматпептидазы и мурамидазы [18]. Этот метод был успешно применен для получения геномной ДНК *Geodermatophilus* sp., чей пептидогликан также относится к типу A1γ [93]. Небольшой размер EndoT5 позволил использовать его ретро-полипептидаком модель для анализа закономерностей формирования белковой глобулы [47], а С-концевое расположение активного центра EndoT5 — изучить на примере этого металлофермента влияние С-кон-

цевой бхГис-метки, металлохелатной хроматографии, а также имидазола на структуру и активность рекомбинантного белка [46]. Могут быть полезны молекулярным биологам не только белки, но и участки генов. Так, *endoT5* имеет очень эффективную область инициации трансляции, в 15–50 раз увеличивающую флуоресценцию маркерного белка, ген которого находится под ее контролем [17].

Исследования L-аланоил-D-глутаматпептидаз продолжаются. Порой практическое применение ферментов опережает их биохимические исследования. Так, успешно проходят доклинические испытания две лекарственных формы химерного рекомбинантного эндолизина LysECD7-SMAP, активного против широкой группы патогенов [96]. Авторы не определяли сайт гидролиза, однако справедливо указывают, что по последовательности и структуре фермент относится к пептидазам M15_C [96]. Также вероятной L-аланоил-D-глутаматпептидазой

является близкий гомолог EndoT5, эндолизин фага *Salmonella sp.* Lys394 [52]. Этот фермент способен лизировать клетки *E. coli* JM109 и MN1 в присутствии пермеабилizующих мембрану магнитных наночастиц [95]. С точки зрения фундаментальной науки, интерес представляют изучение связывания субстрата, установление пространственных структур L-аланоил-D-глутаматпептидаз, а также дальнейшее исследование посттрансляционной активации ионами кальция, выявленной только у ферментов этой группы. Как гидролазы широкого спектра, действующие на самые разнообразные бактерии с пептидогликаном типа А, L-аланоил-D-глутаматпептидазы имеют перспективы применения в биотехнологии и в качестве антибактериальных средств, альтернативных антибиотикам, и в нетерапевтических целях для развития и совершенствования методов молекулярной биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alakomi H.L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et al. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 5, pp. 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
2. Becker S.C., Dong S., Baker J.R., Foster-Frey J., Pritchard D.G. et al. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 294, no. 1, pp. 52–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01541.x>
3. Berry J., Rajaure M., Pang T., Young R. The spanin complex is essential for lambda lysis. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 20, pp. 5667–5674. <https://doi.org/10.1128/JB.01245-12>
4. Berry J.D., Rajaure M., Young R. Spanin function requires subunit homodimerization through intermolecular disulfide bonds. *Mol. Microbiol.*, 2013, vol. 88, no. 1, pp. 35–47. <https://doi.org/10.1111/mmi.12167>
5. Berry J., Savva C., Holzenburg A., Young R. The lambda spanin components Rz and Rz1 undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation. *Protein Sci.*, 2010, vol. 19, no. 10, pp. 1967–1977. <https://doi.org/10.1002/pro.485>
6. Bochtler M., Odintsov S.G., Marcyjaniak M., Sabala I. Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metallopeptidases. *Protein Sci.*, 2004, vol. 13, no. 4, pp. 854–861. <https://doi.org/10.1110/ps.03515704>
7. Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2006, vol. 231, no. 4, pp. 366–377. <https://doi.org/10.1177/153537020623100402>
8. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W. et al. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05870.x>
9. Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J.P. et al. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, no. 7, pp. 3774–3784. <https://doi.org/10.1128/AAC.02668-14>
10. Buckling A., Brockhurst M. Bacteria-virus coevolution. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, vol. 751, pp. 347–370. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3567-9_16
11. Cahill J., Rajaure M., O'Leary C., Sloan J., Marrufo A. et al. Genetic Analysis of the Lambda Spanins Rz and Rz1: Identification of Functional Domains. *G3 (Bethesda)*, 2017, vol. 7, no. 2, pp. 741–753. <https://doi.org/10.1534/g3.116.037192>
12. Cahill J., Young R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers. *Adv. Virus Res.*, 2019, vol. 103, pp. 33–70. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003>
13. Caldentey J., Bamford D.H. The lytic enzyme of the *Pseudomonas* phage phi 6. Purification and biochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, vol. 1159, no. 1, pp. 44–50. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90073-m](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90073-m)

14. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J. et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 2009, vol. 10, Art. 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
15. Catalão M.J., Gil F., Moniz-Pereira J., São-José C., Pimentel M. Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, vol. 37, no. 4, pp. 554–571. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12006>
16. Cheng Q., Nelson D., Zhu S., Fischetti V.A. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 1, pp. 111–117. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.1.111-117.2005>
17. Chernyshov S.V., Masulis I.S., Mikoulinskaia G.V. From DNA to lytic proteins: transcription and translation of the bacteriophage T5 holin/endolysin operon. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2024, vol. 40, no. 8, Art. 256. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04063-2>
18. Chernyshov S.V., Tsvetkova D.V., Mikoulinskaia G.V. A rapid and efficient technique for the isolation of *Bacillus* genomic DNA using a cocktail of peptidoglycan hydrolases of different type. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2022, vol. 39, no 1, Art. 31. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03475-2>
19. Ciepluch K., Maciejewska B., Gałczyńska K., Kuc-Ciepluch D., Bryszewska M. et al. The influence of cationic dendrimers on antibacterial activity of phage endolysin against *P. aeruginosa* cells. *Bioorg. Chem.*, 2019, vol. 91, Art. 103121. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103121>
20. Ciepluch K., Skrzyniarz K., Barrios-Gumie, A., Quintana S., Sánchez-Nieves J. et al. Dendronized silver nanoparticles as bacterial membrane permeabilizers and their interactions with *P. aeruginosa* lipopolysaccharides, lysozymes, and phage-derived endolysins. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10, Art. 2771. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02771>
21. Danis-Włodarczyk K.M., Wozniak D.J., Abedon S.T. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: in vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics*, 2021, vol. 10, no. 12, Art. 1497. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121497>
22. Dion M.B., Oechslin F., Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, vol. 18, pp. 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
23. Dominguez D.C., Guragain M., Patrauchan M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell calcium*, 2015, vol. 57, pp. 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.12.006>
24. Drozdetskiy A., Cole C., Procter J., Barton G.J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.*, 2015, vol. 43, no W1, . W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
25. Drulis-Kawa Z., Majkowska-Skrobek G., Maciejewska B., Delattre A.S., Lavigne R. Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012, vol. 13, no. 8, pp. 699–722. <https://doi.org/10.2174/138920312804871193>
26. Eberhard M., Erne P. Calcium and magnesium binding to rat parvalbumin. *Eur. J. Biochem*, 1994, vol. 222, no. 1, pp. 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18836.x>
27. Eugster M.R., Loessner M.J. Wall teichoic acids restrict access of bacteriophage endolysin Ply118, Ply511, and PlyP40 cell wall binding domains to the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 23, pp. 6498–6506. <https://doi.org/10.1128/JB.00808-12>
28. Fukushima T., Yao Y., Kitajima T., Yamamoto H., Sekiguchi J. Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 2007, vol. 278, no. 4, pp. 371–383. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0255-8>
29. Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M.J. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol*, 2000, vol. 66, no. 7, pp. 2951–2958. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2951-2958.2000>
30. Gangola P., Rosen B.P. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*, 1987, vol. 262, no. 26, pp. 12570–12574. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45243-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45243-X)
31. Gerstmanns H., Criel B., Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnol. Adv.*, 2018, vol. 36, no. 3, pp. 624–640. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.009>
32. Gifford J.L., Walsh M.P., Vogel H.J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.*, 2007, vol. 405, no. 2, pp. 199–221. <https://doi.org/10.1042/BJ20070255>
33. Gil F., Catalao M.J., Moniz-Pereira J., Leandro P., McNei M. et al. The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity. *Microbiology*, 2008, vol. 154, no. 5, pp. 1364–1371. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014621-0>
34. Gilli R., Lafitte D., Lopez C., Kilhoffer M., Makarov A. et al. Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, no. 16, pp. 5450–5456. <https://doi.org/10.1021/bi972083a>

35. Hamilton J.J., Marlow V.L., Owen R.A., Costa Mde A., Guo M. et al. A holin and an endopeptidase are essential for chitinolytic protein secretion in *Serratia marcescens*. *J. Cell Biol.*, 2014, vol. 207, no. 5, pp. 615–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404127>
36. Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, vol. 10, no. 5, pp. 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.002>
37. Hong S., Son B., Ryu S., Ha N.C. Crystal structure of LysB4, an endolysin from *Bacillus cereus* targeting bacteriophage B4. *Mol Cells*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 79–86. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0379>
38. Ikura M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 1996, vol. 21, pp. 14–17. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(06\)80021-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(06)80021-6)
39. Jones H.E., Holland I.B., Campbell A.K. Direct measurement of free Ca(2+) shows different regulation of Ca(2+) between the periplasm and the cytosol of *Escherichia coli*. *Cell Calcium*, 2002, vol. 32, no. 4, pp. 183–192. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001537>
40. Kawasaki H., Nakayama S., Kretsinger R.H. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biomaterials*, 1998, vol. 11, pp. 277–295. <https://doi.org/10.1023/a:1009282307967>
41. Kongari R., Rajaure M., Cahill J., Rasche E., Mijalis E. et al. Phage spanins: diversity, topological dynamics and gene convergence. *BMC Bioinformatics*, 2018, vol. 19, no. 1, Art. 326. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2342-8>
42. Kongari R., Snowden J., Berry J.D., Young R. Localization and Regulation of the T1 Unimolecular Spanin. *J. Virol.*, 2018, vol. 92, no. 22, Art. e00380–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00380-18>
43. Korndörfer I.P., Kanitz A., Danzer J., Zimmer M., Loessner M. J. et al. Structural analysis of the L-alanyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. *Acta Crystallogr.*, 2008, vol. D64, pp. 644–650. <https://doi.org/10.1107/S0907444908007890>
44. Kovalenko A.O., Chernyshov S.V., Kutysenko V.P., Molochkov N.V., Prokhorov D.A. et al. Investigation of the calcium-induced activation of the bacteriophage T5 peptidoglycan hydrolase promoting host cell lysis. *Metallomics*, 2019, vol. 11, no. 4, pp. 799–809. <https://doi.org/10.1039/c9mt00020h>
45. Kuo C.Y., Sinha S., Jazayeri J.A., Pouton C.W. A stably engineered, suicidal strain of *Listeria monocytogenes* delivers protein and/or DNA to fully differentiated intestinal epithelial monolayers. *Mol. Pharm.*, 2009, vol. 6, no. 4, pp. 1052–1061. <https://doi.org/10.1021/mp800153u>
46. Kutysenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Chernyshov S.V., Yegorov A.Y., Prokhorov D.A. et al. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, L-alanyl-D-glutamate peptidase of the bacteriophage T5. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, vol. 124, pp. 810–818. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.219>
47. Kutysenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Molochkov N.V., Prokhorov D.A., Taran S.A. et al. Structure and dynamics of the retro-form of the bacteriophage T5 endolysin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1864, no. 10, pp. 1281–1291. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.018>
48. Kutysenko V.P., Mikoulinskaia G.V., Prokhorov D.A., Molochkov N.V., Yegorov A.Y. et al. On the roles of calcium and zinc ions in the formation of a catalytically active form of the metalloenzyme, L-alanyl-D-glutamate peptidase of the bacteriophage T5 (EndoT5). *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, vol. 164, pp. 2711–2716. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.161>
49. Kutysenko V.P., Prokhorov D.A., Mikoulinskaia G.V., Molochkov N.V., Paskevich S.I. et al. Evidence for the residual tertiary structure in the urea-unfolded form of bacteriophage T5 endolysin. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2017, vol. 35, no. 6, pp. 1331–1338. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1182948>
50. Lai M.J., Lin N.T., Hu A., Soo P.C., Chen L.K. et al. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage ϕ AB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 90, pp. 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3104-y>
51. Larsen K.S., Auld D.S. Carboxypeptidase A: mechanism of zinc inhibition. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, no. 25, pp. 9620–9625. <https://doi.org/10.1021/bi00451a012>
52. Legotsky S.A., Vlasova K.Y., Priyma A.D., Shneider M.M., Pugachev V.G. et al. Peptidoglycan degrading activity of the broad-range *Salmonella* bacteriophage S-394 recombinant endolysin. *Biochimie*, 2014, vol. 107, Pt. B. P. 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.017>
53. Loessner M.J., Kramer K., Ebel F., Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.*, 2002, vol. 44, no. 2, pp. 335–349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>
54. Loessner M.J., Schneider A., Scherer S. A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, no. 3, pp. 1150–1152. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1150-1152.1995>

55. Loessner M.J., Wendlinger G., Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 16, no. 6, pp. 1231–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02345.x>
56. Logan N.A., De Vos P. *Bacillus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Ed. W.B. Whitman. Hoboken N.J. John Wiley & Sons, 2015, pp. 1–164.
57. Lood R., Winer B.Y., Pelzek A.J., Diez-Martinez R., Thandar M. et al. Novel phage lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 4. P. 1983–1991. <https://doi.org/10.1128/AAC.04641-14>
58. Luan S., Wang C. Calcium signaling mechanisms across kingdoms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2021, vol. 37, pp. 311–340. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-035210>
59. Maciejewska B., Roszniowski B., Espallat A., Kęsik-Szeloch A., Majkowska-Skrobek G. et al. *Klebsiella* phages representing a novel clade of viruses with an unknown DNA modification and biotechnologically interesting enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, no. 2, pp. 673–684. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7928-3>
60. Mikoulinskaia G.V., Chernyshov S.V., Shavrina M.S., Molochkov N.V., Lysanskaya V. Y. et al. Two novel thermally resistant endolysins encoded by pseudo T-even bacteriophages RB43 and RB49. *J. Gen. Virol.*, 2018, vol. 99, no. 3, pp. 402–415. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001014>
61. Mikoulinskaia G.V., Chernyshov S.V., Tarlachkov S.V., Mussayeva A.A., Chulin A.N. et al. Endolysin of *Aeromonas* bacteriophage 3: a novel Ca²⁺-activated peptidoglycan hydrolase giving insight into the regulation of phage lysis in Gram-negative bacteria. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2025, vol. 322, Pt. 3, Art. 146934. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146934>
62. Mikoulinskaia G.V., Odinokova I.V., Zimin A.A., Lysanskaya V.Y., Feofanov S.A. et al. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *FEBS J.*, 2009, vol. 276, no. 24, pp. 7329–7342. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07443.x>
63. Mikoulinskaia G.V., Prokhorov D.A., Chernyshov S.V., Sitnikova D.S., Arakelian A.G. et al. Conservative tryptophan residue in the vicinity of an active site of the M15 family L_D-peptidases: a key element in the catalysis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, no. 17, Art. 13249. <https://doi.org/10.3390/ijms241713249>
64. Mirski T., Lidia M., Nakonieczna A., Gryko R. Bacteriophages, phage endolysins and antimicrobial peptides – the possibilities for their common use to combat infections and in the design of new drugs. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2019, vol. 26, no. 2, pp. 203–209. <https://doi.org/10.26444/aaem/105390>
65. Murray E., Draper L.A., Ross R.P., Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses*. 2021. V. 13. № 4. Art. 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680>
66. 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. U. S. A.*, 2001, vol. 98, no. 7, pp. 4107–4112. <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>
67. Nelson D.C., Schmelcher M., Rodriguez-Rubio L., Klumpp J., Pritchard D.G. et al. Endolysins as antimicrobials. *Adv. Virus Res.*, 2012, vol. 83, pp. 299–365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4>
68. Oliveira H., Thiagarajan V., Walmagh M., Sillankorva S., Lavigne R. et al. A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 10, Art. e108376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108376>
69. Owen R.A., Fyfe P.K., Lodge A., Biboy J., Vollmer W. et al. Structure and activity of ChiX: a peptidoglycan hydrolase required for chitinase secretion by *Serratia marcescens*. *Biochem. J.*, 2018, vol. 475, no. 2, pp. 415–428. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170633>
70. Palmer T., Finney A.J., Saha C.K., Atkinson G C., Sargent F. A holin/peptidoglycan hydrolase-dependent protein secretion system. *Mol. Microbiol.*, 2021, vol. 115, no. 3, pp. 345–355. <https://doi.org/10.1111/mmi.14599>
71. Park S., Jun S.Y., Kim C.H., Jung G.M., Son J.S. et al. Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, Art. 18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18535-z>
72. Pastagia M., Euler C., Chahales P., Fuentes-Duculan J., Krueger J.G. et al. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. № 2. P. 738–744. <https://doi.org/10.1128/AAC.00890-10>
73. Payne K.M., Hatfull, G.F. Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 3, Art. e34052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034052>
74. Prokhorov D.A., Mikoulinskaia G.V., Molochkov N.V., Uversky V.N., Kutysenko V.P. High-resolution NMR structure of a Zn²⁺-containing form of the bacteriophage T5 L-alanyl-D-glutamate peptidase. *RSC Adv.*, 2015, vol. 5, pp. 41041 – 41049. <https://doi.org/10.1039/C5RA05993C>

75. Rajaure M., Berry J., Kongari R., Cahill J., Young R. Membrane fusion during phage lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, vol. 112, no. 17, pp. 5497–5502. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1420588112>
76. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.*, 2018, vol. 46, no. D1, pp. D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
77. Roach D.R., Donovan D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*, 2015, vol. 5, no. 3, Art. e1062590. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>
78. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.*, 2014, vol. 42, no. W1, pp. W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
79. Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 1972, vol. 36, no. 4, pp. 407–477. <https://doi.org/10.1128/br.36.4.407-477.1972>
80. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.*, 2012, vol. 7, no. 10, pp. 1147–1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>
81. Schmelcher M., Powell A.M., Camp M.J., Pohl C.S., Donovan D.M. Synergistic streptococcal phage λSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 20. P. 8475–8486. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6579-0>
82. Schmelcher M., Tchang V.S., Loessner M.J. Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microb. Biotechnol.*, 2011, vol. 4, no. 5, pp. 651–662. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00263.x>
83. Schmelcher M., Waldherr F., Loessner M.J. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 93, no. 2, pp. 633–643. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3372-6>
84. Shadrin V.S., Machulin A.V., Dorofeeva L.V., Chernyshov S.V., Mikoulinskaia G.V. Lysis of cells of diverse bacteria by 1, D-peptidases of *Escherichia coli* bacteriophages RB43, RB49 and T5. *J. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 130, no. 6, pp. 1902–1912. <https://doi.org/10.1111/jam.14910>
85. Shavrina M.S., Zimin A.A., Molochkov N.V., Chernyshov S.V., Machulin A.V. et al. In vitro study of the antibacterial effect of the bacteriophage T5 thermostable endolysin on *Escherichia coli* cells. *J. Appl. Microbiol.*, 2016, vol. 121, no. 5, pp. 1282–1290. <https://doi.org/10.1111/jam.13251>
86. Sheehan M.M., García J.L., López R., García P. Analysis of the catalytic domain of the lysin of the lactococcal bacteriophage Tuc2009 by chimeric gene assembling. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, vol. 140, no. 1, pp. 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08309.x>
87. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, vol. 8, no. 3, pp. 302–309. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(52\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(52)90045-0)
88. Solanki K., Grover N., Downs P., Paskaleva E. E., Mehta K.K. et al. Enzyme-based listericidal nanocomposites. *Sci. Rep.*, 2013, vol. 3, Art. 1584. <https://doi.org/10.1038/srep01584>
89. Son B., Kong M., Cha Y., Bai J., Ryu S. Simultaneous control of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* using a hybrid endolysin LysB4EAD–LysSA11. *Antibiotics (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 12, Art. 906. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120906>
90. Son B., Yun J., Lim J.A., Shin H., Heu S. et al. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiol.*, 2012, vol. 12, Art. 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-33>
91. Summer E.J., Berry J., Tran T.A., Niu L., Struck D.K. et al. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 373, no. 5, pp. 1098–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.045>
92. Sychantha D., Little D.J., Chapman R.N., Boons, G.J., Robinson H. et al. PatB1 is an O-acetyltransferase that decorates secondary cell wall polysaccharides. *Nat. Chem. Biol.*, 2018, vol. 14, pp. 79–85. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2509>
93. Tarlachkov S.V., Starodumova I.P., Boueva O.V., Chernyshov S.V., Evtushenko L.I. Deep dive into the diversity and properties of rhodopsins in actinomycetes of the family *Geodermatophilaceae*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2025, vol. 262, Art. 113083. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.113083>
94. Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2002, Chapter 2. Unit 2.3. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00>
95. Usvaliev A.D., Belogurova N.G., Pokholok K.V., Finko A.V., Prusov A.N. et al. *E. coli* cell lysis induced by Lys394 enzyme assisted by magnetic nanoparticles exposed to non-heating low-frequency magnetic field. *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, no. 7, Art. 1871. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071871>

96. Vasina D.V., Antonova N.P., Gushchin V.A., Aleshkin A.V., Fursov M.V. et al. Development of novel antimicrobials with engineered endolysin LysECD7-SMAP to combat Gram-negative bacterial infections. *J. Biomed. Sci.*, 2024, vol. 31, no. 1, Art. 75. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01065-y>
97. Visweswaran G.R., Dijkstra B.W., Kok J. Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea – a comparative view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 92, no 5, pp. 921–928. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3637-0>
98. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M.A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, vol. 32, no. 2, pp. 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
99. Whisstock J.C., Lesk A.M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, vol. 24, no. 4, pp. 132–133. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01366-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01366-3)
100. Yanai A., Kato K., Beppu T., Arima K. Bacteriophage-induced lytic enzyme which hydrolyzes L-alanine-D-glutamic acid peptide bond in peptidoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, vol. 68, no. 4, pp. 1146–1152. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90316-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90316-8)
101. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.*, 1992, vol. 5, no. 3, pp. 430–481. <https://doi.org/10.1128/mr.56.3.430-481.1992>
102. Young R. Phage lysis: do we have the whole story yet? *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013, vol. 16, no. 6, pp. 790–797. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.008>
103. Young R. // Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 3, pp. 243–258. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4087-z>
104. Zampara A., Sørensen M.C.H., Gencay Y.E., Grimon D., Kristiansen S.H. et al. Developing innolysins against *Campylobacter jejuni* using a novel prophage receptor-binding protein. *Front. Microbiol.*, 2021, vol. 12, Art. 619028. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619028>
105. Zampara A., Sørensen M.C.H., Grimon D., Antenucci F., Vitt A.R. et al. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria. *Sci. Rep.*, 2020, vol. 10, no.1, Art. 12087. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68983-3>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ

Микулинская Галина Викторовна — кандидат биологических наук, руководитель Группы молекулярной биотехнологии Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино, Российская Федерация
E-mail: mikulinskaya@bibch.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0596-0003>

Поступила в редакцию 27.03.2026

После доработки 25.05.2026

Принята к публикации 27.05.2026

AUTHOR INFORMATION

Mikoulinskaia, Galina V. — Ph.D. (Biology), Head of the Molecular Biotechnology Group of the Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russian Federation
E-mail: mikulinskaya@bibch.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0596-0003>

Received March 27, 2026

Revised on May 25, 2026

Accepted May 27, 2026