

**Димеризация антимикробного фермента лизостафина с помощью димеризационного домена****Научный руководитель – Лунин Владимир Глебович****Гришин Александр Владимирович***Выпускник (специалист)*

Российский государственный аграрный университет МСХА имени К.А. Тимирязева,  
Агрономии и биотехнологии, Генетики и биотехнологии, Москва, Россия  
*E-mail: grishin-a1@yandex.ru*

Одним из перспективных классов новых антимикробных веществ являются антибактериальные лизины - ферменты, способные расщеплять пептидогликан клеточной стенки бактерий, что приводит к их лизису и гибели. При этом существенным недостатком антибактериальных лизинов является их быстрое выведение из системной циркуляции за счет фильтрации почками. Одним из подходов для повышения времени полувыведения терапевтических белков может быть увеличение молекулярной масса за счет мультимеризации. Было показано, что димеризация лизина Cpl-1 за счет образования дисульфидных связей между остатками цистеина, введенными в последовательность белка, приводила к увеличенному времени циркуляции в кровотоке мышей без негативных последствий для активности белка (Resch et al. 2011). В настоящей работе была исследована возможность димеризации антимикробного лизина лизостафина за счет добавления на его С-конец последовательности димеризационного домена, описанного в работе Gurnon et al. 2003.

Способность белка Lst-HDD к димеризации была подтверждена с помощью гель-фильтрационной хроматографии. Добавление димеризационного домена не повлияло на энзиматическую активность лизостафина: скорость расщепления пентаглицинового пептида (субстрата лизостафина) Lst-HDD оказалась аналогична скорости его расщепления нативным лизостафином. Антибактериальная активность Lst-HDD, однако, была существенно снижена. Минимальная ингибирующая концентрация Lst-HDD в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 равнялась 3.2 мкг/мл, для нативного лизостафина это значение было равно 0.1 мкг/мл. В эксперименте с просветлением суспензии клеток стафилококка Lst-HDD также показал снижение активности. Просветление (снижение мутности) суспензии клеток происходит при их лизисе под действием лизостафина. Суспензия клеток просветлялась наполовину 1 мкг/мл лизостафина за  $11.0 \pm 1.0$  мин, а 1 мкг/мл Lst-HDD - за  $36.2 \pm 2.4$  мин. Для определения влияния димеризационного домена на фармакокинетические характеристики лизостафина, рекомбинантные белки вводились крысам (n=4) внутривенно и образцы крови отбирались через определенные промежутки времени. Остаточное содержание Lst-HDD и лизостафина в плазме определялось с помощью иммуноферментного анализа. Оказалось, что димеризация позволяет замедлить выведение лизостафина. Время полувыведения в фазе элиминации для нативного лизостафина составило 2.1 ч, для Lst-HDD - 2.9 ч, площадь под фармакокинетической кривой составила 4.3 и 6.1 мг\*час/л, соответственно.

Работа поддержана грантом РНФ № 18-15-00235.

**Источники и литература**

- 1) Gurnon D.G., Whitaker J. a, Oakley M.G. Design and characterization of a homodimeric antiparallel coiled coil. // J. Am. Chem. Soc. 2003. Vol. 125, № 25. P. 7518–7519.

- 2) Resch G., Moreillon P., Fischetti V.A. A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance // Int. J. Antimicrob. Agents. 2011. Vol. 38, № 6. P. 516–521.