

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-732>



Иммобилизация красного флюоресцентного белка RFP с помощью модуля GW на пептидогликане молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus acidophilus*

Добрынина О.Ю.[✉], Умяров А.М., Большакова Т.Н., Константинова С.В., Гришин А.В., Лящук А.М., Лунин В.Г.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация

Введение. Пептидогликаны (ПГ) из молочнокислых бактерий являются безопасной платформой для систем поверхностного дисплея гетерологичных белков медицинского назначения. Прикрепление целевых белков к ПГ может происходить при участии белкового модуля GW.

Цель: изучить возможность использования белковых модулей GW в качестве якоря для связывания различных белков с ПГ из молочнокислых бактерий.

Материалы и методы. С помощью генно-инженерных методик получен продуцент модельного слитого белка GW-RFP. Белок выделен и очищен. ПГ молочнокислых бактерий выделены и использованы в реакции связывания с белком GW-RFP. Для контроля протекания реакции использованы методы световой и флюоресцентной микроскопии, электрофорез в полиакриламидном геле.

Результаты. Отработаны методы выделения и очистки ПГ из *Lactococcus lactis* и *L. acidophilus*. Клонирован и экспрессирован в *Escherichia coli* модельный белок GW-RFP, состоящий из красного флюоресцентного белка RFP и модуля GW, соответствующего первому GW-модулю белка AltA *Staphylococcus aureus*. Показано, что белок GW-RFP связывается с ПГ *L. lactis* и *L. acidophilus* в количестве $24,9 \pm 3,7$ мкг белка/100 мкг сырого массы ПГ *L. lactis* и $21,3 \pm 3,3$ мкг белка/100 мкг сырого веса ПГ *L. acidophilus*. Белок GW-RFP можно отделить от ПГ с помощью 0,5 М раствора NaCl.

Заключение. Белковый модуль GW может служить якорем для белков, которые нужно иммобилизовать на ПГ, — как лактококков, так и лактобацилл.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии; *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus acidophilus*; пептидогликан; красный флюоресцентный белок RFP; белковый модуль GW

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Добрынина О.Ю., Умяров А.М., Большакова Т.Н., Константинова С.В., Гришин А.В., Лящук А.М., Лунин В.Г. Иммобилизация красного флюоресцентного белка RFP с помощью модуля GW на пептидогликане молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus acidophilus*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2026;103(1):58–65.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-732>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ISRLFS>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-732>

Application of the GW module for the immobilization of the red fluorescent protein RFP on peptidoglycan from lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*

Olga Yu. Dobrynina[✉], Abdul-Khamit M. Umyarov, Tatiana N. Bolshakova, Svetlana V. Konstantinova, Alexander V. Grishin, Alexander M. Lyaschuk, Vladimir G. Lunin

The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Peptidoglycans from lactic acid bacteria are a safe platform for surface display systems of heterologous proteins for medical purposes. The binding of target proteins to peptidoglycans can occur with the participation of the GW protein module.

Aim: to study the ability of GW module to bind proteins to peptidoglycan derived from lactic acid bacteria.

Materials and methods: The fused protein GW-RFP was obtained with the help of genetically engineering methods. The protein was isolated and purified. Lactic acid bacteria peptidoglycans were isolated and used in the binding reaction with the GW-RFP protein. To monitor the reaction progress, light and fluorescence microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were used.

Results: Methods for isolation and purification of peptidoglycans from *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus acidophilus* have been developed. The recombinant GW-RFP protein consisting of the red fluorescent protein RFP and the GW module the AltA protein of *Staphylococcus aureus* has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. It has been shown that the GW-RFP protein binds to the peptidoglycans from *L. lactis* and *L. acidophilus* in the amount of 24.9 ± 3.7 μg protein/100 μg (w/w) peptidoglycan from *L. lactis* and 21.3 ± 3.3 μg protein/100 μg (w/w) peptidoglycan from *L. acidophilus*. The GW-RFP protein can be removed from the peptidoglycans using a 0.5 M NaCl solution.

Conclusion: The GW module can be used for protein immobilization on the peptidoglycan from both lactococci and lactobacilli.

Keywords: *Lactic acid bacteria; Lactococcus lactis; Lactobacillus acidophilus; peptidoglycan; red fluorescent protein RFP; GW module*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Dobrynina O.Yu., Umyarov A.M., Bolshakova T.N., Konstantinova S.V., Grishin A.V., Lyaschuk A.M., Lunin V.G. Application of the GW module for the immobilization of the red fluorescent protein RFP on peptidoglycan from lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2026;103(1):58–65.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-732>

EDN: <https://www.elibrary.ru/ISRLFS>

Введение

Молочнокислые бактерии представляют собой ряд грамположительных бактериальных видов, утилизирующих углеводы до молочной кислоты. Эти бактерии используются в пищевой промышленности для ферментации и сохранения различных молочных, мясных и овощных продуктов. Им присвоен статус GRAS (generally recognized as safe), что означает признание их в целом непатогенными для человека и животных. Благодаря этому сами молочнокислые бактерии используются как безопасные платформы для систем поверхностного дисплея гетерологичных белков медицинского применения [1].

Пептидогликан (ПГ) клеточной стенки является уникальной структурой, присущей только бактериям. Он придаёт жёсткость бактериальной клетке, защищает её от окружающей среды, определяет её форму и является якорем для различных белков и полимеров. ПГ-каркас образован гликановым гетеромером, состоящим из остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Сетчатая структура гликановых цепей поперечно скреплена короткими пептидными мостиками, состав которых зависит от вида бактерий [2]. Основным различием клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий, кроме одно- и двуслойной мембран, является толщина слоя ПГ — у грамположительных бактерий этот слой составляет 20–80 нм, у грамотрицательных —

2–7 нм [3]. Уникальный состав ПГ, высокое содержание D-аминокислот в пептидных мостиках, необычные амидные мостики делают ПГ для клеток эукариот показателем появления бактерий. Иммуногенная активность ПГ охарактеризована для растений и животных [4, 5].

Предложен метод обработки молочнокислых бактерий, в результате которого из бактериальной клетки образуется ПГ-остов, сохраняющий форму исходных бактерий [6]. Эти бактериеподобные частицы могут экспонировать на своей поверхности различные гетерологичные белки, присоединяемые тем или иным способом к ПГ-остову. Подобные недорогие, безопасные и простые в изготовлении конструкции могут быть использованы для создания вакцинных препаратов, очистки антигенов, иммобилизации ферментов и многого другого [1].

ПГ как адьюванты субъединичных вакцин обладают следующими свойствами: индуцируют иммунитет слизистых, стимулируя выработку IgA и создавая таким образом защиту на входных воротах инфекции; активируют врождённый иммунитет через рецептор TLR-2. Благодаря сохранению формы исходных бактерий, ПГ, выделенные указанным образом, активно поглощаются дендритными клетками и макрофагами, что способствует созреванию дендритных клеток и повышению экспрессии CD80, CD86 и комплекса гистосовместимости МНС-II [1, 5, 7].

На основе ПГ-частиц в настоящее время разрабатываются более 40 различных вариантов вакцинных препаратов против бактериальных, вирусных и паразитарных инфекций, вызываемых *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, ВИЧ, вирусом гриппа, вирусом болезни Ньюкасла, MERS-CoV, респираторно-синтициальным вирусом, вирусом гепатита E, ротавирусом, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum* [1].

Экспозиция белков на поверхности бактериеподобных частиц используется для получения иммунного ответа (антигенный дисплей, антительный дисплей), вакцинных препаратов, для изменения метаболизма (ферментный дисплей) [1, 5].

Целевые белки прикрепляются к ПГ двумя основными способами — ковалентно или нековалентно. Нековалентное связывание белков с клеточной стенкой, благодаря ионным взаимодействиям, осуществляется при участии определенных белковых доменов, присутствующих в целевых белках [8].

Один из таких доменов — модуль GW [9]. Этот модуль состоит из 7 β -цепей, 5 из них сложены в открытую бочкообразную конформацию. Консервативный GW-дипептид (глицин-триптофан) находится в четвертой β -цепи. Длина GW-модуля равна примерно 80 аминокислотным остаткам, рI этого модуля около 10, поэтому он имеет средство в первую очередь к кислым лигандам (липотейхоевая кислота, гепарин, белок-рецептор gClq-R) [10]. Однако предполагается, что при недоступности тейхоевых и липотейхоевых кислот белки, слитые с модулем GW, могут связываться с ПГ [11, 12]. GW-модуль белка AmI *Listeria monocytogenes* опосредует связь с эукариотическими клетками Caco-2, Hep G2 [10, 13]. Выявлен ряд поверхностных белков грамположительных бактерий с GW-модулями (аутолитические ферменты *S. pneumoniae*, амидаза *Staphylococcus saprophyticus* [14], аутолизин *S. aureus* [15], амидаза, ПГ-гидролаза и интерналин *L. monocytogenes* [16, 17]). Белки с GW-модулями не только иммобилизованы на поверхности клетки, но могут быть частично секретированы в среду. Благодаря модулям GW достигается эволюционно-адаптированный механизм, обеспечивающий гибкость в локализации и функциональности поверхностных белков [18].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности использования GW-модулей для связывания белков с ПГ молочнокислых бактерий. Для этого были получены препараты ПГ из бактерий *Lactococcus lactis* и *L. acidophilus*. В качестве целевого белка был использован сконструированный рекомбинантный модельный белок, состоящий из модуля GW белка AtlA *S. aureus* и репортерного красного флюоресцентного белка mRFP1.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и среды

Для выделения ПГ использовали культуры молочнокислых бактерий *L. lactis* подвида *lactis* AA119 и *L. acidophilus* AA141 из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Бактерии выращивали на среде MRS (Mann-Rogosa-Sharpe medium; «Himedia») или в бульоне ВНИ (Brain-Heart Infusion; «Himedia») с добавлением 2% глюкозы при 37°C без аэрации. Клонирование белка GW-RFP проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) с плазмидой pREP4. Для получения продукта *E. coli* выращивали в специальной среде для аутоиндукции [19].

Получение препаратов пептидогликана

Обработку клеток *L. lactis* и *L. acidophilus* проводили в соответствии с методом, описанным в работе [6], с модификациями [20]. Бактерии выращивали до стационарной фазы, собирали центрифугированием (10 мин, 8000g), отмывали водой и определяли вес сырой массы клеток. Полученную массу суспендировали в 0,25% растворе додецилсульфата натрия (SDS) из расчёта 10 мл раствора на 1 г сырой массы клеток. Данную суспензию выдерживали в кипящей водяной бане 2 ч с перемешиванием, клетки отмывали водой (примерно 3–4 раза до прекращения образования пены, осаждали 10 мин при 13 000g). Осадок суспендировали в 10% трихлоруксусной кислоте из расчёта 2 мл на 100 мг сырой массы осадка, эту суспензию выдерживали в кипящей водяной бане 30 мин с перемешиванием. Смесь охлаждали, отмывали водой до рН воды, взятой для промывания.

Полученный в результате осадок суспендировали в 0,1 N HCl из расчёта 3 мл на 100 мг осадка. Эту суспензию также выдерживали в кипящей водяной бане 30 мин с перемешиванием, охлаждали и отмывали водой до рН воды, взятой для промывания. Осаждение ПГ при отмывках проводили с помощью центрифугирования при 13 000g в течение 10 мин.

Полученный осадок ПГ взвешивали и суспендировали в 10 mM фосфатном буфере рН 7,0 из расчёта 100 мг сырой массы осадка в 1 мл буфера. Полученный препарат ПГ в 10 mM фосфатном буфере рН 7,0 с азидом натрия (200 мкг/мл) хранили в холодильнике (не замораживая).

Конструирование и выделение белка GW-RFP

Нуклеотидная последовательность, кодирующая модуль GW белка AtlA *S. aureus* ATCC 29213 [9], была синтезирована компанией «Евроген». Источником гена флюоресцентного белка mRFP1 послужила плазида pTEasy-RFP из коллекции НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Ген, кодирующий слитый белок GW-RFP с гексагистидиновым тагом на N-конце, собран стандарт-

ными генно-инженерными методами и клонирован в плазмиду pQE13, в которой промотор T5 был заменён на промотор T7. Полученная плазида трансформирована в штамм *E. coli* BL21(DE3), несущий плазмиду pREP4. Клетки продуцента собирали центрифугированием при 7000g в течение 15 мин.

Для выделения белка биомассу ресуспендировали в 10-кратном объёме лизирующего буфера pH 8,0 (50 mM имидазола, 50 mM NaCl, 0,1% Тритон X-100, 1 mM MgCl₂) с 150 мкг/мл лизоцима и 40 ЕД/мл бензоназы [21], инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Суспензию обрабатывали ультразвуком на дезинтеграторе «Bandelin Sonopuls HD3200» («Bandelin») при 70% амплитуде в течение 5 мин. После этого лизат центрифугировали при 10 000g и 4°C в течение 30 мин, супернатант наносили на колонку с сорбентом «Workbeads 40 Ni-NTA» («Bio Works»), уравновешенную буфером А (50 mM имидазол, 150 mM NaCl, pH 8,0), промывали буфером А с добавлением 0,1% тритона X-100, затем буфером А с добавлением 1 M NaCl и буфером А для удаления NaCl. Белок GW-RFP элюировали буфером (700 mM имидазол, 150 mM NaCl, pH 8,0) и диализовали против дистиллированной воды. Концентрация белка составила 5,3 мг/мл. Раствор полученного целевого белка хранили при -18°C.

Реакция связывания белка GW-RFP с пептидогликаном

К 400 мкг сырой массы ПГ, суспендированного в 10 mM фосфатном буфере pH 7,0, добавляли 100 мкг белка GW-RFP из водного раствора, довели объём реакционной смеси до 300 мкл таким же фосфатным буфером (10 mM, pH 7,0) и выдерживали 30 мин при комнатной температуре со слабым перемешиванием. Далее смесь центрифугировали 10 мин при 13 000g, осадок суспендировали в 40 мкл того же буфера. Полученный осадок анализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по стандартной методике. Контролем служили пробы ПГ, подвергающиеся таким же манипуляциям, но без добавления белка GW-RFP.

Определение белка

Определение концентрации белка и пептидов проводили методом Лоури.

Световая и флюоресцентная микроскопия

Для микроскопического анализа полученные препараты ПГ окрашивали стандартным методом по Граму. Для флюоресцентной микроскопии 5 мкл суспензии ПГ со связанным белком GW-RFP наносили на предметное стекло и высушивали на воздухе. После нанесения иммерсионного масла для флюоресценции образцы были изучены с помощью микроскопа «Zeiss Axio Imager Z1» («Zeiss»), оснащённого камерой «Cascade II» («Photometrics»).

Результаты

Получение препаратов пептидогликана

Применённая обработка молочнокислых бактерий приводит к образованию нежизнеспособных частиц, состоящих в основном из каркаса ПГ. Нежизнеспособность таких частиц доказывается отсутствием роста при высеве суспензии препаратов ПГ на твёрдую среду MRS. На микрофотографиях, представленных на **рис. 1**, видно, что полученные препараты ПГ частично сохраняют форму бактерий (видны пустые оболочки), однако ПГ прокрашивается генцианвиолетом слабее, чем исходные бактерии. Количество пептидов в ПГ определяли методом Лоури, значения приведены в **таблице**. На **рис. 2** представлена электрофореграмма полученных препаратов ПГ в полиакриламидном геле, пустые дорожки доказывают отсутствие в них молекул белков, высвобождающихся при обработке SDS. Однако в препаратах ПГ выявляется заметное количество пептидов (таблица).

Маркерный белок GW-RFP

В настоящем исследовании модуль GW из белка Alt *S. aureus* был слит с целевым белком — красным флюоресцентным белком mRFP1. Аминокислотная последовательность этого рекомбинантного белка следующая:

10	20	30	40	50	60
MRGSHNNHHN	GSKAGGTVTP	TPNTKLTVAA	NNGVAQIKPT	NSGLYTTVYD	KTGKATNEVQ
70	80	90	100	110	120
KTFAVSKTAT	LGNQKFYLVQ	DYNSGNKFGW	VKEGDVVYNT	AKSPVNVNQS	YSIKSGTKLY
130	140	150	160	170	180
TVPWGTSKQV	AGSVSGSGNQ	TFKASKQQQI	DKSIYLYGSV	NGKSGWVSKA	YLRSSVASSE
190	200	210	220	230	240
DVIKEFMRFK	VRMEGSVNGH	EFEIEGEGEG	RPYEGTQTAK	LKVTKGGPLP	FAWDILSPQF
250	260	270	280	290	300
QYGSKAYVKH	PADIPDYLKL	SFPEGFKWER	VMNFEDGGVV	TVTQDSSLQD	GEFIYKVKLR
310	320	330	340	350	360
GTNFPDGPV	MQKKTMGWEA	STERMYPEDG	ALKGEIKMRL	KLKDDGGHYDA	EVKTTYMAKK
370	380	390	400		
PVQLPGAYKT	DIKLDITSHN	EDYTIVEQYE	RAEGRHSTGA,		

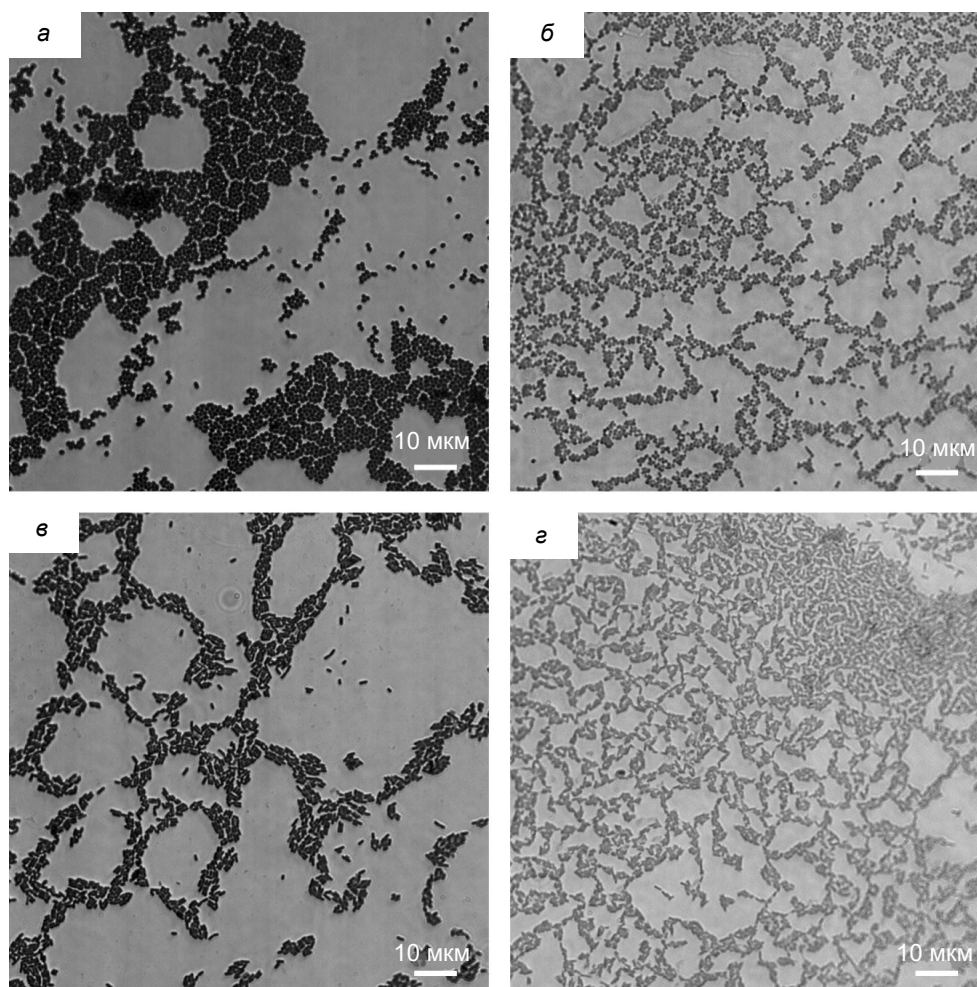


Рис. 1. Молочнокислые бактерии и ПГ, полученные из них (окраска по Граму).
а — *L. lactis*; б — ПГ из *L. lactis*; в — *L. acidophilus*; г — ПГ из *L. acidophilus*.

где 5–10 аминокислотные остатки (а. о.) — гексагистиновый таг; 11–174 а. о. — модуль GW; 175–400 а. о. — белок RFP.

Водный раствор полученного рекомбинантного белка GW-RFP1 (с молекулярной массой 44,5 кДа) имеет тёмно-розовую окраску. Её интенсивность зависит от концентрации белка в растворе [22].

Реакция связывания белка GW-RFP с пептидогликаном

Возможность участия модуля GW в связывании белков с ПГ молочнокислых бактерий проверяли в реакции связывания. О степени связывания рекомбинантного белка с ПГ судили по появлению тёмно-розового осадка после отделения супернатанта в конце реакции. Помимо этого проверяли количество белка в осадке и супернатанте как с помощью электрофореза (рис. 2), так и в реакции определения белка по Лоури.

На электрофореграмме (рис. 2) видно, что белок, связавшийся с ПГ, соответствует белку GW-RFP.

Предполагалось, что белок, связавшийся с ПГ, останется в осадке, а несвязавшийся белок выявится в супернатанте. Удалось подобрать количество белка GW-RFP, связывающегося с определённым количеством ПГ. Оказалось, что со 100 мкг сырого веса ПГ *L. lactis* связывается примерно 0,56 нмоль белка GW-RFP, а со 100 мкг сырой массы ПГ *L. acidophilus* — 0,48 нмоль (таблица).

Из данных литературы известно, что степень связывания белков с ПГ зависит от ионной силы раствора — чем она выше, тем слабее связываются белки [11]. Действительно, добавление буферного раствора, содержащего 0,5 М NaCl, к осадку ПГ как *L. lactis*, так и *L. acidophilus* с иммобилизованным белком GW-RFP приводила к диссоциации белка и переходу его в супернатант (таблица; рис. 2). Таким образом, белки, связанные с ПГ с помощью модуля GW, можно элюировать, используя растворы с большой ионной силой.

Хранение препаратов ПГ при 4°C в буферном растворе с азидом натрия, лиофилизация, автоклавирование (15 мин, 121°C), замораживание (–18°C,

Связывание белка GW-RFP с ПГ *L. lactis* и *L. acidophilus*

Проба	<i>L. lactis</i>		<i>L. acidophilus</i>	
	осадок (мкг пептидов на 100 мкг ПГ)	супернатант (мкг белка в 300 мкл 10 мМ фосфатного буфера pH 7,0)	осадок (мкг пептидов на 100 мкг ПГ)	супернатант (мкг белка в 300 мкл 10 мМ фосфатного буфера pH 7,0)
ПГ	16 ± 5	0	15,2 ± 1,7	0
ПГ, связанный с белком GW-RFP	24,9 ± 3,7	0	21,3 ± 3,3	0
ПГ, связанный с белком GW-RFP, а затем обработанный 0,5 М раствором NaCl	0	118,2	0	106

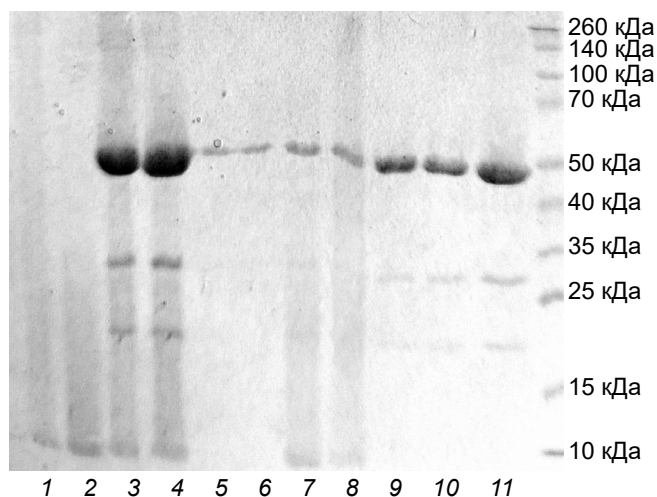


Рис. 2. Электрофореграмма реакции связывания белка GW-RFP с ПГ *L. lactis* и *L. acidophilus* (окраска Кумасси). 1 и 2 — ПГ *L. lactis* (1), *L. acidophilus* (2) и до присоединения белка; 3 и 4 — осадки после реакции связывания ПГ *L. lactis* (3), *L. acidophilus* (4) с белком GW-RFP; 5 и 6 — супернатанты после реакции связывания ПГ *L. lactis* (5), *L. acidophilus* (6) с белком GW-RFP; 7 и 8 — осадки ПГ *L. lactis* (7), *L. acidophilus* (8) после реакции связывания с белком GW-RFP и инкубации в присутствии 0,5 М NaCl; 9 и 10 — супернатанты после реакции связывания ПГ *L. lactis* (9), *L. acidophilus* (10) с белком GW-RFP и инкубации в присутствии 0,5 М NaCl; 11 — белок GW-RFP.

72 ч) и оттаивание не влияли на связывающие свойства ПГ (данные не приведены).

Судя по флюоресцентным микрофотографиям (рис. 3), ПГ, полученные методом, предложенным в работе, в основном сохраняют форму исходных лактобактерий (кокки и бациллы), а связывающийся флюоресцентный белок GW-RFP образует светящийся ореол вокруг частиц.

Обсуждение

Обработка клеток грамположительных бактерий SDS вызывает разрыхление клеточной стенки, а последующая тепловая обработка в присутствии трихлоруксусной и соляной кислот удаляет тейхоевые кислоты, липиды, большую часть белков и ДНК [20]. Заметное количество пептидов в ПГ — это пептидные шивки гликановых цепей (таблица). За счёт этих пептидных мостиков происходит частичное сохранение формы клеток микроорганизма, из которого получен ПГ (в нашем случае это кокки и бациллы). Полученные препараты безопасны для человека и животных, не содержат живых бактерий, не требуют для своего выделения дорогостоящих реактивов и приборов. Эти препараты можно применять для стимуляции врождённого иммунного ответа в качестве вакцинных адьювантов.

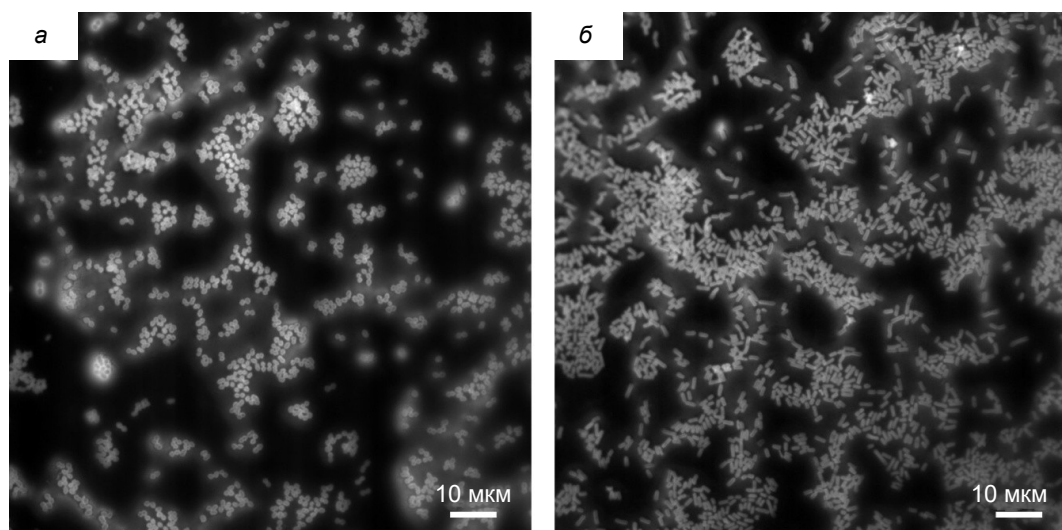


Рис. 3. Флюоресцентная микрофотография ПГ, связавших белок GW-RFP. а — ПГ из *L. lactis*; б — ПГ из *L. acidophilus*.

Белок Alt *S. aureus* относится к адгезинам и автолизинам и содержит в своей молекуле область с несколькими повторами GW (глицин-триптофан). Наличие этих модулей позволяет микроорганизму надёжно связываться с клеточной стенкой клеток хозяина [9]. Слияние модуля GW с репортерной частью — красным флюоресцентным белком RFP привело к созданию удобной модели, позволяющей увидеть связывание белка с осадком ПГ по появлению тёмно-розовой окраски осадка. Окраска белка исчезает в присутствии SDS, это указывает на то, что для проявления окраски важно сохранение соответствующей конформации белка RFP. Тёмно-розовая окраска осадка после связывания белка с ПГ подтверждает, что иммобилизация модельного белка с помощью модуля GW не меняет исходную конформацию репортерной части.

Флюоресцентные микрофотографии показывают, что иммобилизация модельного белка с модулем GW происходит на наружной поверхности частиц ПГ.

Заключение

Для получения ПГ были использованы молочнокислые бактерии, имеющие статус GRAS, т. е. полностью безопасные для человека и животных. Выделенные из этих бактерий ПГ удобны для проведения различных манипуляций, стабильны в хранении.

Самое очевидное использование ПГ молочнокислых бактерий — это создание на их платформе иммунных препаратов и вакцин. Такие препараты получают экономически выгодными, т. к. не сложны в производстве и обеспечивают сильный иммунный ответ при упрощённой схеме вакцинации [1, 7].

Модуль GW, извлечённый из его естественного контекста, сливается с целевыми белками, и таким образом можно связать интересующий белок с богатой ПГ клеточной стенкой грамположительных бактерий для использования в качестве субъединичных вакцин и получить стабильный и биодоступный препарат.

В данной работе показано, что белок, содержащий модуль GW, хорошо связывается с ПГ, полученными из молочнокислых бактерий, как лактококков, так и лактобацилл.

Известные модули GW очень разнообразны по размерам, аминокислотному составу, поэтому при создании иммунных препаратов можно подобрать наиболее подходящие варианты конструкций с целевыми белками для сохранения нужной для правильного иммунного ответа конформации и оптимального связывания с ПГ молочнокислых бактерий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Zhou X., Gao M., De X., et al. Bacterium-like particles derived from probiotics: progress, challenges and prospects. *Front. Immunol.* 2023;14:1263586. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1263586>
- Garde S., Chodisetti P.K., Reddy M. Peptidoglycan: structure, synthesis, and regulation. *EcoSal Plus.* 2021;9(2):eESP-0010-2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2020>
- Galinier A., Delan-Forino C., Foulquier E., et al. Recent advances in peptidoglycan synthesis and regulation in bacteria. *Biomolecules.* 2023;13(5):720. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13050720>
- Turner R.D., Vollmer W., Foster S.J. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol. Microbiol.* 2014;91(5):862–74. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.12513>
- Sun Q., Liu X., Li X. Peptidoglycan-based immunomodulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022;106(3):981–93. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11795-4>
- Bosma T., Kanninga R., Neef J., et al. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(1):880–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.72.1.880-889.2006>
- Raya-Tonetti F., Müller M., Sacur J., et al. Novel LysM motifs for antigen display on lactobacilli for mucosal immunization. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21691. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01087-8>
- Zhydetski A., Glowacka-Grzyb Z., Bukowski M., et al. Agents targeting the bacterial cell wall as tools to combat gram-positive pathogens. *Molecules.* 2024;29(17):4065. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules29174065>
- Oshida T., Sugai M., Komatsuzawa H., et al. A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995;92(1):285–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.285>
- Marino M., Banerjee M., Jonquières R., et al. GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J.* 2002;21(21):5623–34. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf558>
- Zoll S., Schlag M., Shkumatov A.V., et al. Ligand-binding properties and conformational dynamics of autolysin repeat domains in staphylococcal cell wall recognition. *J. Bacteriol.* 2012;194(15):3789–802. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00331-12>
- Percy M.G., Karinou E., Webb A.J., Gründling A. Identification of a lipoteichoic acid glycosyltransferase enzyme reveals that GW-domain-containing proteins can be retained in the cell wall of *Listeria monocytogenes* in the absence of lipoteichoic acid or its modifications. *J. Bacteriol.* 2016;198(15):2029–42. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00116-16>
- Milohanic E., Jonquières R., Cossart P., et al. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol. Microbiol.* 2001;39(5):1212–24. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02208.x>
- Hell W., Reichl S., Anders A., Gatermann S. The autolytic activity of the recombinant amidase of *Staphylococcus saprophyticus* is inhibited by its own recombinant GW repeats. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003;227(1):47–51. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00647-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00647-5)
- Biswas R., Voggu L., Simon U.K., et al. Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;259(2):260–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x>

16. Bublitz M., Polle L., Holland C., et al. Structural basis for auto-inhibition and activation of Auto, a virulence-associated peptidoglycan hydrolase of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 2009;71(6):1509–22.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06619.x>
17. Carvalho F., Sousa S., Cabanes D. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014;4:48. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00048>
18. Braun L., Dramsi S., Dehoux P., et al. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol. Microbiol.* 1997;25(2):285–94.
DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4621825.x>
19. Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 2005;41(1):207–34.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>

Информация об авторах

Добрынина Ольга Юрьевна[✉] — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dobryninaolga0201@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1069-7572>

Умяров Абдулхамит Мустафович — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, boltanya2@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-3378-4204>

Большакова Татьяна Николаевна — д-р биол. наук, в. н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, dobotan@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1411-651X>

Константинова Светлана Васильевна — н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, sv.konstantinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9273-5423>

Гришин Александр Владимирович — канд. биол. наук, н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, grishin-a1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1436-9015>

Ляцук Александр Михайлович — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, lamy13@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1806-7575>

Лунин Владимир Глебович — д-р биол. наук, проф., в. н. с. лаб. биологически активных наноструктур НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия, lunin1955@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1050-1787>

Вклад авторов: Добрынина О.Ю. — дизайн исследования, анализ научной литературы, получение препаратов ПГ, проведение экспериментов, анализ результатов, написание и оформление статьи; Умяров А.М. — культивирование микроорганизмов, получение препаратов ПГ, анализ результатов; Большакова Т.Н. — дизайн исследования, получение препаратов ПГ, проведение экспериментов, анализ результатов, анализ научной литературы написание и оформление статьи; Константинова С.В. — получение генно-инженерных конструкций, выделение и очистка флуоресцентного белка; Гришин А.В. — получение генно-инженерных конструкций, выделение и очистка белка, анализ научной литературы, анализ результатов, написание и оформление статьи; Ляцук А.М. — получение генно-инженерных конструкций, создание штамма-продуцента; Лунин В.Г. — концепция и направление исследования, анализ результатов, общее руководство. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.10.2025;
принята к публикации 08.12.2025;
опубликована 26.02.2026

20. Bertsche U., Gust A.A. Peptidoglycan isolation and binding studies with LysM-type pattern recognition receptors. *Methods Mol. Biol.* 2017;1578:1–12.
DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6_1
21. Бокша И.С., Лунин В.Г., Данилова М.С. и др. Рекомбинантные эндопептидазы IdeS IdeZ и возможный потенциал их применения. *Биохимия.* 2023;88(6):900–12. Boksha I.S., Lunin V.G., Danilova T.A., et al. Recombinant endopeptidases IdeS and IdeZ and their potential applications. *Biochemistry.* 2023;88(6): 900–12. DOI: <https://doi.org/10.31857/S0320972523060027> EDN: <https://elibrary.ru/edqmnbb>
22. Gadella T.W.J. Jr., van Weeren L., Stouthamer J., et al. mScarlet3: a brilliant and fast-maturing red fluorescent protein. *Nat. Methods.* 2023;20(4):541–5.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01809-y>

Information about the authors

Olga Yu. Dobrynina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, dobryninaolga0201@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1069-7572>

Abdul-Khamit M. Umyarov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, boltanya2@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0009-3378-4204>

Tatiana N. Bolshakova — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, dobotan@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1411-651X>

Svetlana V. Konstantinova — scientific researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, sv.konstantinova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9273-5423>

Alexander V. Grishin — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, grishin-a1@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1436-9015>

Alexander M. Lyaschuk — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, lamy13@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1806-7575>

Vladimir G. Lunin — Dr. Sci. (Biol.), Professor, leading researcher, Laboratory of biologically active nanostructures, The Honorary Academician N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, lunin1955@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-1050-1787>

Authors' contribution: Dobrynina O.Yu. — research design, analysis of scientific literature, isolation of PG, carrying out of experiments, analysis of research results, writing the article; Umyarov A.M. — bacteria cultivation, isolation of PG, analysis of research results; Bolshakova T.N. — research design, isolation of PG, carrying out of experiments, analysis of research results, analysis of scientific literature, writing and preparation the article; Konstantinova S.V. — creation of genetically engineered constructs, isolation and purification of fluorescent protein; Grishin A.V. — creation of genetically engineered constructs, isolation and purification of protein, analysis of scientific literature, analysis of research results, preparation the article; Lyaschuk A.M. — construction of recombinant plasmid, creation of the producer strain; Lunin V.G. — research concept, analysis of research results, general guidance. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 01.10.2025;
accepted for publication 08.12.2025;
published 26.02.2026