

Jowita Samanta Niczyporuk, Michał Bartoszcze

FAGOWE ENZYMY LITYCZNE – NOWE NADZIEJE W WALCE Z ZAKAŻENIAMI BAKTERYJNYMI

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
Szef Ośrodka: Michał Bartoszcze

Fagowe enzymy lityczne produkowane są podczas replikacji bakteriofagów w komórkach bakteryjnych. Powodując lizę ścian komórek bakteryjnych, umożliwiają uwolnienie się cząstek fagowych na zewnątrz. Enzymy bakteriofagów wykazują wysoką swoistość, dzięki czemu mogą niszczyć wybrane gatunki bakterii, także odporne na antybiotyki, dzięki czemu stwarzają nowe możliwości w walce z zakażeniami bakteryjnymi.

Słowa kluczowe: fagowe enzymy, liza bakterii, nowy kierunek leczenia
Key words: phage enzymes, bacteria lysis, new treatment possibilities

WSTĘP

W 1896 r brytyjski bakteriolog *Ernest Hankin* zaobserwował przeciwbakteryjne właściwości wody z rzek Ganges i Junna w Indiach wobec *Vibrio cholerae*, a w 1898 r. Rosjanin *Gamaleya* wykrył podobne zjawisko w przypadku *Bacillus subtilis*. Po dwudziestu latach *Twort* postawił hipotezę istnienia bakteriofagów, w dwa lata później *D'Herelle* czynniki te nazwał fagami, sugerując, że są one żywymi wirusami, a nie enzymami, i po raz pierwszy użył fagów przy leczeniu czerwonki bakteryjnej (1). Pierwsza publikacja na temat leczenia fagami gronkowcowych schorzeń skóry ukazała się w 1921 r. W tym czasie uruchomiono w Paryżu produkcję pięciu fagowych preparatów przeciwko chorobom bakteryjnym: *Bacte-coli-phage*, *Bacte-rhino-phage*, *Bacte-intestini-phage*, *Bacte-pyo*, *Bacte-staphy-phage*. W 1940 r. w Eli Lilly Company (Indianapolis) podjęto produkcję fagowego lizatu przeciwko gronkowcom, paciorkowcom i pałeczkom okrężnicy. Terapeutyczne fagi będące w czystych lizatach, mogą zawierać jeszcze wiele zanieczyszczeń włączając endotoksyny, powodując występowanie niekorzystnych efektów ubocznych (1).

Trudności z otrzymaniem czystych preparatów oraz pojawienie się antybiotyków wpłynęło ujemnie na rozwój badań nad bakteriofagami. Natomiast problemy związane z narastaniem anybiotykooporności spowodowały ponowne zainteresowanie się bakterio-

fagami. Dziś terapią fagową interesuje się NATO, czego przykładem jest preparat zwany PhageBioDerm, który ma zastosowanie w profilaktyce zakażeń ran oparzeniowych.

Bakteriofagi lityczne powodują lizę komórki gospodarza, dzięki specyficznym enzymom destabilizującym ściany komórkowe bakterii, dla uwolnienia z niej potomnych wirusów. Inne bakteriofagi muszą zdegradować lub osłabić peptydoglikan dla zabicia komórki. Bakteriofag dla rozpoczęcia infekcji, musi połączyć się ze specyficznym receptorem umiejscowionym na powierzchni komórki bakteryjnej (2). Bakteriofagowe enzymy lityczne produkowane są podczas normalnego cyklu replikacji fagów. Są one białkami, których domena na końcu aminowym, wykazuje aktywność enzymatyczną (hydroliza wiązania peptydoglikozydowego), podczas gdy domena na końcu karboksylowym, odpowiada za specyficzne wiązanie do węglowodanowego epitopu w ścianie bakterii. Przy wyborze fagów litycznych należy pamiętać o możliwości horyzontalnego transferu genów toksyn bakteryjnych i genów antybiotykooporności lizogenicznych fagów.

ENZYMY LITYCZNE BAKTERIOFAGÓW

Enzymy lityczne dzieli się na dwie grupy. Do pierwszej z nich należy lizozym, który hydrolizuje wiązania N-acetylmuraido-1,4- β -N-acetylglukozaminowe. Drugą grupę reprezentują amidazy N-acetylmuramido-L-alaninowe, hydrolizujące wiązania pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a L-alaniną (2). Fagowe lizyny reprezentują tę samą grupę wysoce specyficznych enzymów jak autolizyny gospodarza (3). Muramidaza jest enzymem fagowym, otrzymywanym z kolifaga γ , amidaza jest produktem kolifaga T7, aminopeptydaza i endopeptydaza, pochodzą z faga γ phis, którego gospodarzem jest *Pseudomonas phaseolicola*.

Lityczne enzymy bakteriofagów do degradacji ściany komórkowej potrzebują dodatkowego białka błonowego – choliny, co wiąże się z tym, że większość endolizyn nie posiada sekrecyjnych sekwencji sygnałnych. Cholina, umożliwiając endolizynom dostęp do mureiny kontroluje lizę komórki bakteryjnej (3). W pewnych przypadkach produkowane są również cholinowe inhibitory, zapewniające równowagę całego procesu lizy (2). Zachodzące na siebie geny (*Rz* oraz *Rz1*) fagów zakażających bakterie Gram ujemne kodują pomocnicze proteiny lizujące *Rz* i *Rz1*, których funkcja nie jest jeszcze dokładnie poznana. Być może współdziałają one w interakcji z zewnętrzną błoną lub z jej połączeniami ze ścianą komórkową (2). Geny choliny i endolizyny (odpowiednio *S* i *R*) u faga λ , ulokowane są na początku grupy genów późnej transkrypcji, uruchamianych około 8 minut po rozpoczęciu replikacji i produkowanych od tej pory konstytutywnie. Endolizyna gromadzi się w cytozolu komórki, do czasu, kiedy cholina powoduje permeabilizację błony komórkowej, zatrzymując procesy metaboliczne, co umożliwi endolizynie dostęp do mureiny. Cholina może także powodować aktywację enzymu muralitycznego na zewnątrz komórki, co opisano w przypadku enzymu LytA (amidaza pochodząca ze *Streptococcus sp.*) (2).

BAKTERIOFAGOWE ENZYMY PRZECIWKO PACIORKOWCOM

Streptococcus pyogenes (β -hemolityczne *Streptococcus* grupy A) jest czynnikiem etiologicznym m. in. paciorkowcowego zapalenia gardła, gorączki reumatycznej i zapalenia kłębuszkowego nerek u ludzi. W Stanach Zjednoczonych na bakteryjne zapalenie gardła

zapada 2,5 miliona ludzi rocznie, z czego ponad 80% przypada na dzieci poniżej 15 roku życia. U 35% pacjentów leczonych na paciorkowcowe zapalenie gardła, penicylina jest nieskuteczna. Nosicielstwo tych bakterii u ludzi, dochodzące nawet do 50% przypadków, powoduje dalsze rozprzestrzenianie się zakażeń. Terapia antybiotykowa w przypadku nosicielstwa może powodować wzrost oporności bakterii na antybiotyki, co jest zjawiskiem niepożądanym (4, 5).

Bakteriofag C_1 , zdolny do swoistej infekcji *Streptococcus* grupy C produkuje enzym, który po izolacji i oczyszczeniu powoduje lizę ściany komórek tych bakterii (także u grupy A i *E Streptococcus*). Enzym ten o masie 50 kDa występuje jako dimer. Wykazano możliwość użycia enzymu faga C_1 w przypadkach zapalenia gardła wywołanego przez *Streptococcus* C dla celów profilaktycznych i terapeutycznych (4).

Bakteriofagowa lizyna C_1 niszczy paciorkowce grupy A (różnych typów serologicznych) już po 5 minutach ekspozycji, a do perforacji osłon komórki wystarczy zaledwie kilka cząsteczek enzymu. Także bakterie z grupy C oraz E, są podatne na działanie tego enzymu, jednak w mniejszym stopniu. Paciorkowce z grup B, D, F, G, L oraz N są niewrażliwe na lizynę C_1 , co świadczy o swoistości działania enzymu. Patogeny jamy ustnej takie jak: *S. oralis*, *S. intermedius*, *S. mutans* i inne także nie są podatne na działanie enzymu. Jedynie w przypadkach *S. gordonii*, wykazano niewielką aktywność lizyny C_1 . Dla porównania przebadano także bakterie Gram – dodatnie, często znajduwane wśród flory jamy ustnej (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), oraz Gram – ujemne (*Escherichia coli*, *Neisseria lactamica*, *Pseudomonas aeruginosa*). Mimo podobieństwa w budowie peptydoglikanu wszystkich wspomnianych bakterii, były one niewrażliwe na lityczne działanie enzymu faga C_1 (4). Bakteriofagowa lizyna otrzymana z faga C_1 paciorkowców – PlyC jest wyjątkowa wśród enzymów litycznych bakteriofagów. Wszystkie bowiem znane lizyny są białkami syntetyzowanymi jako monomer, podczas gdy PlyC jest białkiem multimerycznym. Charakterystyka molekularna operonu PlyC wykazuje, że koduje on dwa oddzielne polipeptydy PlyCA i PlyCB. Wykazano, że aktywność katalityczną wykazuje holoenzym składający się z ośmiu podjednostek PlyCB przypadających na jedną podjednostkę PlyCA. Za aktywność enzymatyczną PlyC odpowiedzialna jest podjednostka PlyCA, natomiast PlyCB tworzy oktamer, który z kolei może wiązać się ze ścianą komórkową (6).

W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że 1000 U lizyny powoduje zniszczenie około 10^7 komórek *Streptococcus sp.*, już po 5 sekundach od ekspozycji. Badania mikroskopem elektronowym wykazały, że po 15 sekundach działania lizyny następuje wyraźna degradacja ściany komórkowej, prowadząca do śmierci bakterii (4).

Streptococcus sp., grupy B (GBS) lub *Streptococcus agalactiae* są główną przyczyną posocznicy i zapalenia opon mózgowych u noworodków, natomiast GBS cechuje się także wysoką zachorowalnością i śmiertelnością u ludzi dorosłych z obniżoną odpornością immunologiczną. Otrzymano zrekombinowany enzym PlyGBS, zdolny do degradacji *Streptococcus grupy B*, a pojedyncza dawka enzymu podana myszom znacząco redukowała bakteryjną kolonizację w pochwie, jamie ustnej i gardle (7).

Zrekombinowany PlyGBS porównano do lizyny Cpl-1 oraz Ply187, wskazując, że PlyGBS posiada trzy różne domeny. Domena N-końcowa wykazuje 27% podobieństwo do domeny Ply187, funkcjonującej jako endopeptydaza. Domena środkowa jest w 46% identyczna z domeną N-końcową Cpl-1 o funkcji muramidazy. Trzecia, C-końcowa domena PlyGBS nie wykazuje natomiast podobieństwa do innych enzymów litycznych. Dalsze

badania wykazały, że domena SH3b odpowiedzialna jest za wiązanie enzymu do ścian komórkowych (8). Domena pierwsza jest aminohydrolazą/peptydazą zależną od cysteiny/histydyny (CHAP, *cysteine histidine-dependent aminohydrolase/peptidase*). Natomiast druga jest acetylmuramidazą. Każda domena hydrolazowa degraduje peptydoglikan, niezależnie od innych domen hydrolazowych. Endopeptydaza CHAP tnie specyficzne wiązania peptydowe między D-alaniną i L-alaniną znajdującymi się między peptydami rdzenia peptydoglikanu a mostkami poprzecznymi (9). *Donovan* i wsp. (2006) przeprowadzili badania nad poznaniem funkcyjnych domen aktywności hydrolaz peptydoglikanu poprzez serię mutacji delecyjnych i określenia ich wpływu na aktywność lityczną. Wszystkie badane konstrukty pochodziły z pełnej długości genu endolizyny faga B30, uprzednio wklonowanego do plazmidu pET21a, z dodaniem markera histydynowego na końcu C. Wykonano serię mutacji delecyjnych wykorzystując metodę PCR. Zmutowane plazmidy były wprowadzane do *Escherichia coli* w celu scharakteryzowania i ekspresji genów. Badania wykazały, że domena CHAP zachowuje swoją aktywność przy długości 125-156 aminokwasów (sama domena CHAP składa się 107 aminokwasów), czyli aż do 50 aminokwasów pozostaje poza konserwatywną sekwencją domeny. Ten dodatkowy odcinek może być niezbędny dla właściwego kształtowania domeny CHAP. Jednocześnie udowodniono, że CHAP nie wymaga obecności domeny SH3b do prawidłowego utrzymania aktywności litycznej. Podobną metodę zastosowano w badaniach nad określeniem C-końca domeny o funkcji glikozydazy, w których wykazano, że domena C-końca enzymu SH3b jest niezbędna do prawidłowego działania domeny środkowej – muramidazy. Dodatkowe badania nad końcem N endolizyny potwierdziły tę hipotezę (10).

Aktywność PlyGBS *in vitro* określono na 40 jednostek PlyGBS w 37°C przez 60 min; aktywność enzymu mierzy się przy użyciu spektrofotometru przy długości fali OD 600, obserwując szybkość spadku adsorpcji. Enzym PlyGBS wykazuje znaczną aktywność lityczną wobec *Streptococcus* grup: A, C, G i L oraz brak lub niewielką aktywność w przypadku grupy D, E, N. Aktywność średnią do niskiej, zaobserwowano wobec *S. salivarius*, *S. gordonii* i *S. mutans*, a całkowity brak działania przy *B. cereus* i *S. aureus*, *L. acidophilus*, *L. crispatus* oraz pochwoowych komensalach bakteryjnych. Do wizualizacji efektów litycznych bakteriofagowych enzymów stosowano mikroskop fazowo-kontrastowy lub mikroskop elektronowy. Planuje się wykonanie badań nad mutacjami PlyGBS w celu zwiększenia specyficzności i aktywności enzymu, a następnie jego zastosowanie w terapii zakażeń paciorkowcami (7).

Lys K –BAKTEROFAGOWY ENZYM LITYCZNY PRZECIWKO GRONKOWCOM

Bakteriofagowa lizyna LysK wykazuje szerokie spektrum aktywności litycznej wobec gronkowców, łącznie z metycylinoopornymi szczepami *S. aureus*. Ze względu na nabywanie przez gronkowce oporności na stosowane antybiotyki, stwarzają one wiele problemów zdrowotnych. *Flaherty* i wsp. (2005) przeprowadzili doświadczenie oparte na klonowaniu, a następnie ekspresji LysK ekstrahowanej z faga K z *Lactococcus lactis*. Już w 1950 r. wyekstrahowano z lizatów fagowych enzym, nazwany virolizyną, który był skuteczny jedynie przeciwko martwym komórkom. Enzym Pal (Phage Associated Lysin) wykazuje niszczące działanie zarówno wobec żywych jak i martwych komórek *S. aureus*. LysK po-

czątkowo była klonowana do *E. coli* tak, by gen dla białka LysK znajdował się pod kontrolą promotora T7 i była związana z innym białkiem, oraz markerem his-tag. Powstające białko było nierozpuszczalne i tworzyło ciało inkluzyjne w komórce. Z tego powodu gen enzymu wprowadzono do *L. lactis* (NZ9800), a ekspresję białka indukowano niziną. Lizaty *Lactococcus sp* zawierające zrekombinowaną LysK, hamowały wzrost *Staphylococcus sp.*, m.in. szczepów wywołujących *mastitis* u bydła, szczepów vankomycynoopornych i opornych na targocid oraz szczepów MRSA izolowanych od pacjentów w szpitalach. LysK może być potencjalnym lekiem przeciwko gronkowcom opornym na stosowane antybiotyki (11).

Wall i wsp. (12) prowadzili badania nad zastosowaniem lizostafiny w walce z gronkowcowym zapaleniem gruczołu mlekowego u krów. Dzięki ekspresji hydrolazy peptydoglikanu gronkowców, lizostafiny, jako transgenu w gruczołach klonowanego bydła, uzyskano odporność na zakażenie gruczołu mlekowego bakteriami *S. aureus* wprowadzonych bezpośrednio do kanału gruczołów mlecznych. Lizostafina tnie specyficznie most pięcioglicynowy w peptydoglikanie gronkowców. Co więcej, jest aktywna przeciwko wielolekoopornym szczepom *S. aureus* oraz wykazuje aktywność lityczną przeciwko innym bakteriom powodującym zakażenia gruczołów mlekowych (13).

Gen endolizyny bakteriofaga B30 został ostatnio sklonowany, po czym stwierdzono, że endolizyna wykazuje aktywność lityczną wobec gatunków *S. agalactiae* i *S. disagalactiae*. powodujących zapalenie gruczołu mlekowego. Ta 443-aminokwasowa hydrolaza zawiera domenę endopeptydazową (CHAP) oraz domenę lizozymową (Acm), z których każda może funkcjonować niezależnie od drugiej. Endolizyna GBS B30 nie posiada zdolności litycznej wobec *S. aureus* (9).

Ponieważ domeny endolizyn fagowych mogą działać niezależnie zachowując specyficzność, fuzja różnych domen może stworzyć nowe możliwości w walce z patogenami odpowiedzialnymi za zakażenie gruczołu mlekowego. Białko fuzyjne zbudowane z lizostafiny i endolizyny faga B30 powstało dzięki połączeniu 443-aminokwasowej wersji endolizyny B30 (pozbawiona His-tag) z dojrzałą formą lizostafiny (aminokwasy 235 do 480) (13, 14), która z kolei została zmodyfikowana w celu wyeliminowania potencjalnych miejsc przyłączenia oligosacharydów. Tak powstała końcowa fuzja 443-Lyso, a skrócone białko B30-182 zostało połączone z taką samą lizostafiną tworząc 182-Lyso. Oba konstrukty aktywnie lizują *S. aureus* i te same gatunki paciorkowców, co macierzysta lizyna B30 (13).

Jest to pierwszy przypadek chimerycznej hydrolazy peptydoglikanu posiadającej aktywność lityczną przeciwko dwu bakteriom. Białko fuzyjne endolizyna-lizostafina może być produkowane w hodowlach komórek ssaków, jako faza początkowa późniejszego tworzenia transgenicznych zwierząt (13).

BAKTERIOFAGOWE LITYCZNE ENZYMY PRZECIWIW *BACILLUS ANTHRACIS*

Bacillus anthracis jest potencjalnym czynnikiem ataku biologicznego, zaklasyfikowanym do grupy A broni biologicznej (15). Przetrawniki laseczek węgliką po dostaniu się do płuc są transportowane przez makrofagi do węzłów chłonnych otaczających płuca, gdzie kiełkują, po czym namnażając się, wytwarzają toksyny, co może prowadzić do śmierci 99% zakażonych organizmów. Oporne na antybiotyki laseczki węgliką zwiększają zagrożenie

w przypadku intencjonalnego użycia tej bakterii jako broni biologicznej. Stwarza to konieczność poszukiwania nowych, skuteczniejszych metod walki z tym zarazkiem (16).

Lizynę PlyG otrzymuje się z faga γ , swoistego dla *B. anthracis*, który został wybrany do izolacji ze względu na jego wysoką specyficzność i możliwość zastosowania do identyfikacji metodą typowania fenotypowego (17).

Badania nad rekombinowaną lizyną PlyG wykazały, że jest to białko monomeryczne o przypuszczalnej masie względnej ok. 27000 Da. W celu określenia aktywności oraz specyficzności enzymu badano wiele szczepów z grupy *B. cereus* pochodzących z różnych kolekcji na świecie. Oporny na streptomycynę szczep *B. cereus* ATCC 4342 (oznaczony jako RSVF1) wykazywał wrażliwość na PlyG, podobnie jak szczepy z gatunku *B. anthracis*. Na działanie enzymu podatny był także, chociaż w małym stopniu szczep *B. cereus* ATCC 10987, blisko spokrewniony z *B. anthracis*. Wszystkie bakterie z innych gatunków użyte w tym doświadczeniu, były odporne na działanie enzymu. W obecności 20U PlyG, w ciągu 15 minut dochodziło do niemal całkowitego zniszczenia szczepu RSVF1, a miano szczepu ATCC 10987 zostało obniżone stukrotnie. Warto podkreślić, że mikrokapsułkowanie niektórych szczepów laseczki wąglika nie zapobiega dostępowi enzymu do ściany komórkowej bakterii (16). W wyniku działania enzymu litycznego u bakteriofaga γ , PlyG, dochodzi do uwolnienia niektórych komponentów bakteryjnych, takich jak ATP – komórkowego źródła magazynowanej energii. Uwolnienie ATP ma miejsce już po 10 sekundach od dodania 2U do 1×10^4 komórek RSVF1. Reakcja powyższa może być wykorzystana do identyfikacji *B. anthracis* (16).

Mimo, że teoretycznie możliwe jest uodpornienie się bakterii na działanie faga, to bakterie RSVF1 pozostają ciągle wrażliwe na działanie enzymu PlyG. Mutanty tych bakterii, odporne na działanie antybiotyków, były wrażliwe na ten enzym. Także mutagenesa z zastosowaniem takich środków, jak ester etylowy kwasu metanosiarkowego (EMS), nie wpływała na działanie PlyG. Nabycie przez patogeny oporności na fagowe enzymy lityczne wydaje się w chwili obecnej mało prawdopodobne (16).

Peptydoglikan przetrwalników jest chroniony przed lizozymami i amidazami przez białkopodobną osłonę, jednakże w czasie 10 minut po wzbudzeniu procesu kiełkowania, wzrasta porowatość osłon i enzym zdolny jest do destrukcji komórek bakteryjnych RSVF1. Dzięki wykorzystaniu sekwencji genu PlyG do poszukiwań innych lizyn przez porównanie homologii, odnaleziono sekwencję lizyny nazwanej PlyPH, której nazwa pochodzi od szerokiego zakresu pH, w którym enzym zachowuje aktywność. Porównanie sekwencji nukleotydowej tych lizyn wskazuje na niewielkie podobieństwo w części N-końcowej enzymów, co pozwala wnioskować o różnicach występujących w domenach katalitycznych. Wysoki stopień podobieństwa w domenach C-końcowych, przemawia za tym, że PlyPH rozpoznaje ten sam epitop, co PlyG. Podobnie jak PlyG, PlyPH jest wysoce specyficzny dla *B. anthracis* szczepu Sterne oraz *B. cereus* RSVF1. Dużą zaletą PlyPH jest także zdolność do selektywnej lizy bakterii RSVF1 w mieszaninie różnych komórek bakteryjnych (18). Niedawno odkryty gen lizyny PlyL w genomie laseczki wąglika wykazuje 93% podobieństwa do PlyG w regionie katalitycznym, oraz 60% podobieństwa w regionie wiążącym do ściany komórki bakterii. Enzym ten, w przeciwieństwie do wysoce specyficznych PlyG oraz PlyPH, jest aktywny w stosunku do licznych szczepów z rodzaju *Bacillus* (19).

BADANIA *IN VIVO*

Lizyny fagowe, tak jak każdy potencjalny terapeutyk, wymagają wielu testów w celu określenia ich specyficzności, skuteczności, bezpieczeństwa, nieszkodliwości czy trwałości. Pozytywne wyniki badań nad zastosowaniem fagowych enzymów litycznych wobec szeregu bakterii *in vitro* skłoniły badaczy do rozpoczęcia eksperymentów *in vivo*. Wykazano skuteczność enzymu PlyGBS w walce z bakteriami grupy *B. Streptococcus* (GBS), kolonizującymi drogi rozrodcze u myszy. Zakażenie dootrzewnowe myszy niektórymi szczepami *B. cereus* (RSVF1) może prowadzić do szybkiej śmierci zwierząt. Stwierdzono, że podanie 50U enzymu litycznego w 5 minut po iniekcji wpływa korzystnie na przebieg choroby, przy czym użyta lizyna PlyGBS nie wywołuje efektu mutagennego u badanych zwierząt (7).

Bardzo podobne badania nad możliwością zastosowania PlyPH w celach terapeutycznych przeprowadzono u myszy zakażanych szczepem RSVF1 wykazując, że około 40% zwierząt przeżywało infekcję, a enzym PlyPH nie wywierał przy tym żadnego negatywnego wpływu na badane zwierzęta (18).

Uzyskano także korzystne efekty leczenia myszy zakażonych zjadliwym szczepem *B. anthracis*, którym podano PlyG po 15 minutach od zakażenia. Po 12 dniach 10% zwierząt zakażonych padło, podczas gdy 90 % zostało wyleczonych (16, 20). Jado i wsp. (21) zakażali myszy opornym na antybiotyki szczepem 6B *S.pneumoniae* i w 1 godzinę po infekcji podawano im Pal i Cpl-1. Zwierzęta leczone przeżyły infekcję, a miano bakterii we krwi zwierząt było znacznie niższe w porównaniu z grupą kontrolną- nie leczoną. Obserwowano także synergistyczne działanie użytych enzymów w terapii zwierząt. W dalszych doświadczeniach badano wpływ równoczesnego stosowania gentamycyny i enzymów fagowych na bakterie, wykazując synergistyczne działanie obu składników, uzależnione od stopnia oporności bakterii na antybiotyki.

W badaniach *in vivo* nie wykazano ujemnego wpływu fagowych enzymów na organizm. Stwierdzono ponadto, że otrzymane w sztuczny sposób przeciwciała przeciwko enzymom nie wpływają na aktywność lityczną samych enzymów, co jest obserwacją niezwykle istotną (16, 18).

PODSUMOWANIE

Bakteriofagowe enzymy lityczne są niezbędne w procesie replikacji bakteriofaga przy infekcji Gram - dodatnich bakterii. Dzięki swym wyjątkowym właściwościom, wysokiej specyficzności i aktywności katalitycznej, mogą stać się skutecznym narzędziem w walce z infekcjami. Ich wysoka specyficzność pozwala na dobór enzymu w zależności od rodzaju patogenu będącego przyczyną choroby. Nie wykazują one przy ich stosowaniu efektów ubocznych. (16, 18)

Fagowe enzymy lityczne mogą stać się także skutecznym lekiem przeciwko bakteriom opornym na antybiotyki, stanowiąc nową formę terapii. Dzięki swojej specyficzności wobec konkretnych bakterii, enzymy nie oddziałują na inne drobnoustroje, co daje im przewagę nad antybiotykami (22). Nowe możliwości terapii z użyciem fagowych enzymów w sytuacji zmierzchu ery antybiotykowej wydają się niezwykle cenne (2). Terapia fagowymi enzymami znajduje zastosowanie na polu walki, jako skuteczny lek w przypadku zakażeń

ran żołnierzy, jednocześnie preparaty tego typu mogą znaleźć swoje miejsce w domowych apteczkach (1). Fagowe enzymy lityczne mogą okazać się niezwykle pomocne przy zwalczaniu czynników broni biologicznej. Większość, naturalnie występujących szczepów *B. anthracis* jest wrażliwa na antybiotyki, jednakże czas konieczny dla podjęcia skutecznego leczenia zakażeń sporami węgliką jest krótki (nie przekracza 48 godzin). Enzymy bakteriofagowe, w połączeniu z terapią antybiotykową, mogą wydłużyć ten okres i hamować rozwój zakażenia. Mogą one zostać uznane za alternatywną formę leczenia w przypadkach oporności szczepów *B. anthracis* na antybiotyki (16).

Ponieważ bakteriofagi znajdują się u niemal wszystkich patogennych bakterii jak np. *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella Typhi*, *Borrelia burgdorferi* i inne., należy sądzić, że możliwe będzie odkrycie dalszych enzymów skutecznych przeciwko wymienionym patogenom.

J S Niczyporuk, M Bartoszcze

PHAGE LYTIC ENZYMES – NEW HOPE IN BATTLE AGAINST BACTERIAL INFECTIONS

SUMMARY

Bacteriophage lytic enzymes are produced during phage replication cycle in bacterial cells. Lysis of bacterial cell wall enables release of virus particles. Bacteriophage enzymes activity are highly specific, therefore they are able to destroy selected bacterial species, also resistant to antibiotics. This creates new possibilities in therapy of bacterial infections.

PIŚMIENNICTWO

1. Sandeep K. Bacteriophage Drug Against Bacterial Infections. *Curr Science* 2006; 90:631-3.
2. Young I, Wang I, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 2000; 8:120–8.
3. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 1992; 56: 430-81.
4. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group *A streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98:4107-12.
5. Broudy TB, Pancholi V, Fischetti VA. Induction of lysogenic bacteriophage and phage-associated toxin from group *A streptococci* during coculture with human pharyngeal cells. *Infect Immun* 2001; 69:1440-3.
6. Nelson D, Schuch R, Chahales P, i in. PlyC: A Multimeric Bacteriophage Lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 10765–70.
7. Cheng Q, Nelson D, Shiwei Z, i in. Removal of Group *B Streptococci* Colonizing the Vagina and Oropharynx of Mice with a Bacteriophage Lytic Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 111-7.
8. Whisstock JC, Lesk AM. SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:132-3.
9. Pritchard DG, Dong S, Baker JR, i in. The bifunctional peptidoglycan lysine of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiol* 2004;150:1079-87.
10. Donovan DM, Foster-Frey J, Dong S, i in. The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* Bacteriophage B30 Endolysin relies on the Cysteine,Histidine-dependent Aminohydrolase/Peptidase domain. *Appl Environment Microbiol* 2006; 72:5108-12.

11. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, i in. The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant Staphylococci, Including Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2005; 187:7161-4.
12. Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, i in. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. Nat Biotechnol 2005; 23:445-51.
13. Donovan DM, Dong S, Garrett W, i in. Peptidoglycan Hydrolase Fusions Maintain Their Parental Specificities. Rouseau Appl Environ Microbiol 2006; 72: 2988-96.
14. Heinrich P, Rosenstein R, Böhmer M, i in. The molecular organization of the lysostaphin gene and its sequences repeated in tandem. Mol Gen Genet 1987; 209:563-9.
15. Oncu S, Oncu S, Sakarya S. Anthrax – an overview. Med Sci Monit 2003; 9:RA276-Ra283.
16. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A Bacteriolytic agent that Detects and Kills *Bacillus anthracis*. Nature 2002; 418:884-9.
17. Brown ER, Cherry WB, Moody MD, i in. Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. J Infect Dis 1955; 96:34-9.
18. Yoong P, Schuch R, Nelson D, i in. PlyPH, a Bacteriolytic Enzyme with a Broad pH Range of Activity and Lytic Action against *Bacillus anthracis*. J Bacteriol 2006; 88:2711-4.
19. Low YL, Yang C, Perego M, i in. Structure and lytic activity of *Bacillus anthracis* prophage endolysin. J Biol Chem 2005; 280:35433-9.
20. Fischetti VA. Using phage Lytic Enzymes to Control Pathogenic Bacteria. BMC Oral Health 2006; 6(Suppl 1):S16.
21. Jado I, López R, García E, i in. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 967-73.
22. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:375-7.

Otrzymano: 19.02.2007 r.

Adres autora:

Lek. Wet. Jowita Samanta Niczyporuk
Ośrodek Diagnostyki i Zwalczenia Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy
Tel./Fax 081 886 28 22