

ПЕПТИДОГЛИКАНЛИЗИРУЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

© 2006 г. К. А. МИРОШНИКОВ, О. В. ЧЕРТКОВ,
П. А. НАЗАРОВ, В. В. МЕСЯНЖИНОВ

*Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН*

I. Введение. II. Фаговая терапия – история и перспективы. III. Белковые и пептидные протибактериальные соединения. IV. Цитолитические ферменты бактериофагов. V. Классификация ПЛФ. VI. Модульное строение ПЛФ. VII. Практическое применение энзимов, ограничения и перспективы.

I. ВВЕДЕНИЕ

Первый широко известный антибиотик, пенициллин, был открыт почти 80 лет назад. С тех пор производство антибиотиков стало одной из крупнейших отраслей фармакологической промышленности с оборотом более 25 миллиардов долларов США в год [1]. Однако, хотя антибиотики и спасли бесчисленное количество жизней, их широкое использование привело к стремительному росту числа новых бактериальных штаммов, устойчивых к ним. Так, если в начале «эры антибиотиков» *Streptococcus pneumoniae* проявляли высокую чувствительность к пенициллину, то в последнее время в некоторых регионах 25% штаммов *S. pneumoniae* к пенициллину устойчивы

Принятые сокращения: LPS – липополисахариды, ПЛФ – пептидогликанлизирующие ферменты, РБЛ – мембрано-проникающий регуляторный белок лизиса, гр – продукт гена.

Адрес для корреспонденции: kmi@ibch.ru, vvm@ibch.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-50829 и Wellcome Trust № 071271/Z/03/Z.

[1, 2]. Установлено также, что большинство из исследованных 480 современных штаммов рода *Streptomyces* оказались устойчивыми к 6–8 различным антимикробным препаратам, причем у некоторых из них диапазон устойчивости доходит до 20 антибиотиков разных классов [3]. Появление всевозрастающего количества резистентных к антибиотикам патогенных микроорганизмов стало побудительным мотивом для поиска альтернативных терапевтических путей борьбы с ними.

Низкомолекулярные антибиотики – лишь один из примеров противобактериальных веществ, возникших в эволюционном соревновании между бактериями и другими живыми существами. Другим широко известным примером антибактериальных агентов служат бактериофаги.

II. ФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ – ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Вирусы бактерий, иначе называемые бактериофагами, – крупнейшая из известных групп вирусов. Современная классификация бактериофагов, основанная на морфологических особенностях вирусных частиц (вирионов), включает 13 семейств, подразделенных более чем на 140 родов, содержащих более 5300 видов фагов [4]. Большинство бактериофагов имеют двухцепочечную геномную ДНК, реже встречаются небольшие группы фагов с одноцепочечной ДНК, а также с двух- и одноцепочечной РНК. Хвостатые бактериофаги, выделенные в отряд *Caudovirales*, составляют 96% из всех известных фагов [5]. Все эти фаги имеют икосаэдрическую головку и спиральный хвост с уникальной структурой. В головке помещается геномная ДНК, а внутри хвоста находится хвостовой стержень или канал, по которому осуществляется инъекция генома фага при инфицировании клетки-хозяина. Хвост заканчивается базальной пластинкой, к которой прикрепляются фибриллы или шипы, посредством которых фаг распознает рецепторы на поверхности бактериальной клетки. Хвостатые фаги разделяются на три семейства в зависимости от размеров, гибкости и сократимости хвостов [4, 5]. Хотя известно еще около 190 видов полиэдрических, нитчатых и плеоморфных бактериофагов, подразделенных на 10 небольших семейств, далее в обзоре будут рассматриваться в основном фаги *Caudovirales*, как наиболее широко представленные и хорошо изученные.

Способность фагов экспоненциально реплицироваться и уничтожать патогенные штаммы бактерий указывает на то, что они могут играть важную роль в борьбе с инфекционными заболеваниями.

Действительно, использование фагов в качестве лечебных препаратов было предложено и успешно испытано Брийонгом и Майсином [6] и Д'Эрелем [7] еще в 1920-х годах. В широких масштабах фаговая терапия была впервые применена под руководством Моррисона для профилактики и лечения эпидемии холеры в колониальной Индии в 1930–32 г.г. Было показано, что среди населения штата Наогаон, принимавшего фаговые препараты, уровень смертности был в сотни раз ниже, чем в соседних регионах, отказавшихся от такой помощи [8].

При участии Д'Эреля в Советском Союзе был основан Тбилисский институт фагов. Во время Великой Отечественной войны фаговые препараты, разработанные институтом, широко применялись для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Однако опубликованные материалы носили в большей степени описательный характер, а рекомендации не соответствовали современным фармакологическим стандартам. Многие из полученных результатов были впоследствии утеряны [1, 9, 10]. На Западе же, в связи с неудачами клинических испытаний, недостатком теоретических данных и быстрым развитием индустрии синтетических антибиотиков, исследования в области фаговой терапии были фактически свернуты и не проводились в течение всей второй половины XX века [11].

В последнее десятилетие вновь появляется интерес к использованию фагов для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, и в настоящее время это направление считается достаточно перспективным. Исследователями приложено много усилий для доведения фаговой терапии до уровня надежного клинического инструмента. В опубликованных обзорах обсуждается применение живых фагов на животных и клинических моделях для лечения бактериальных инфекций, для доставки иммуногенных пептидов или ДНК-вакцин, ассоциированных с модифицированными фаговыми частицами, а также перспективы и ограничения этих методов [1, 2, 8–10, 12–17]. Не останавливаясь подробно на конкретных примерах применения фаговой терапии и ранних работах, перечислим основные тезисы цитируемых публикаций.

Левин и Булл [13] сформулировали основной постулат оценки эффективности фаговой терапии – снижение количества инфекционных бактерий до уровня, с которым уже может справиться защитная система организма.

Перед применением фаговой терапии необходимо выполнить ряд важных, зачастую определяющих требований [16, 17]:

1. Не следует применять фаговую терапию, пока не будет достаточно хорошо изучена биология лечебного фага. Поскольку системы взаимодействия фага с бактерией-хозяином исключительно сложны, выполнение этого условия вполне логично. Нередко трудно понять, почему фаг, который эффективно реплицирует в бактериальной культуре, оказывается непригодным для лечения бактериальной инфекции. Понимание вопроса требует количественного анализа динамики процесса фагового инфицирования, особенно в опытах *in vivo*.

2. Применяемые для терапии бактериофаги должны быть литическими, т.е. их развитие происходит немедленно и сопровождается уничтожением клетки-хозяина. Следует по возможности избегать использования в лечебных целях умеренных фагов, которые обладают замедленным действием и развиваются лизогенным путем встраивания собственного генома в геном бактерии.

3. Препараты фага должны содержать инфекционные для бактерий частицы фага, поэтому необходимо соблюдать особые условия хранения препарата.

4. Препараты фага должны отвечать всем требованиям безопасности и не иметь бактериальных или иных токсических загрязнений.

Большинство описанных случаев применения фаговой терапии основано на пероральном приеме фаговых препаратов. Этот способ нельзя считать максимально эффективным, к тому же он несет в себе риск множества побочных эффектов, обусловленных загрязнением препарата примесями, включая эндотоксины и экзотоксины.

Для оценки возможных осложнений во время фаговой терапии полезно знание полного генома бактериофага, поскольку некоторые фаги могут нести гены факторов вирулентности или токсинов [18]. При анализе геномов гигантских бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* [19–21] было обнаружено, что продукты ряда генов имеют большое сходство с функционально неизвестными белками различных организмов. Это наблюдение стоит принимать во внимание перед разработкой методов терапевтического применения фагов, так как некоторые продукты генов могут быть токсичными для человека.

Другими примерами существующей генной опасности, связанной с фагами, и, соответственно, возможных побочных эффектов терапии, могут служить фаго-ассоциированные токсины ботулизма, дифтерии [18], холеры [22], а также конверсия *Tox- S. pyogenes* в *Tox+* бактерию под действием фага [23].

5. Должен быть известен рецептор фага. В популяции из $10^6 - 10^8$ бактерий существует вероятность спонтанных мутаций с потерей или изменением рецептора, что снижает эффективность фаговой терапии.

6. Эффективность фаговой терапии должна быть предварительно проверена на соответствующей животной модели. Характер поведения каждого фага *in vivo* индивидуален. В настоящий момент совокупность данных о фармакокинетике действия фагов по-прежнему очень мала. Проведенные исследования показали, что титр фагов, поступивших в кровь мышей после перорального приема, падает на семь порядков в течение двух часов. Фаги эффективно выводятся из кровотока ретикулоэндотелиальной системой печени и селезенки. Эта проблема частично решается поиском «долгоциркулирующих» мутантов фагов, способных дольше сохраняться в кровотоке и, следовательно, быть более эффективными терапевтически [24].

Описание фармакокинетики чрезвычайно затрудняется самореплицирующейся природой фага. Параметры роста фага *in vitro* нельзя напрямую переносить в ситуацию *in vivo*, поскольку значения этих параметров могут заметно отличаться для каждого конкретного фага [25]. Список критических параметров включает в себя скорость адсорбции фага, латентный период, начальную дозу фага, уровень вязкости, промежутки времени, ассоциированные с каждым из этапов развития фага, а также скорость выведения фаговых частиц из организма ретикулоэндотелиальной системой.

6. Необходима проверка иммуногенности фага. С одной стороны, иммуногенность является важным параметром фармакокинетики фаговой терапии, а с другой – ею могут быть обусловлены серьезные побочные эффекты, вплоть до анафилактического шока. Большинство фагов при первичном применении являются «нео-антигенами» для организма животных и человека, т.е. заранее имеющихся против них антител в организме нет. Экспериментально показано, что при однократном приеме иммунный ответ на присутствие фагов в организме невелик, не вызывает четко выраженных токсических явлений и не влияет на терапевтический эффект фага. Однако стимуляция адаптивной иммунной системы при многократном применении фага потенциально более опасна [14, 15].

Таким образом, несмотря на несомненную перспективность применения бактериофагов в качестве противобактериальных препаратов, их внедрение в лечебную клинику идет очень медленно. Существует множество ограничений, продиктованных требованиями фармакологической индустрии, которые не могут учесть всех сложностей взаимодействия живых систем. Соответственно, очевидным экспериментальным выходом из возникшего тупика стало приложение возможностей современной молекулярной биологии, геной и белковой инженерии к изучению в качестве противобактериальных

препаратов не цельных вирусных частиц, а их компонентов, токсичных для бактерий.

III. БЕЛКОВЫЕ И ПЕПТИДНЫЕ ПРОТИВОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

Для большинства эукариотических организмов, от грибов до человека, первичной реакцией на внедрение патогенных микроорганизмов служит синтез эндогенных пептидов, называемых «антимикробными пептидами» [26]. Такие пептиды закодированы в геноме организма. Их индукция [27] или образование путем специфического протеолитического расщепления других белков организма [28] происходит вскоре после микробной инфекции, и они действуют с высокой скоростью, нейтрализуя широкий диапазон микробов. Пептиды взаимодействуют с бактериями, образуя в их клеточных оболочках трансмембранные поры и ионные каналы, дестабилизирующие бактериальные клетки. Большинство этих пептидов небольшого размера (<10 кДа), имеют катионную или амфипатическую природу и по особенностям структуры могут быть подразделены на 5 основных групп. За последние 20 лет выделено более 700 биологически активных антимикробных пептидов, некоторые из которых прошли клинические испытания [29].

Недавно Ротем и сотр. [30] обнаружили, что геномы бактериофагов кодируют последовательности, которые имеют сходство с антимикробными пептидами. Чаще всего аминокислотная последовательность с предсказанными свойствами антимикробного пептида – не самостоятельный продукт гена, а небольшая часть, вероятно, отдельный домен более крупного полипептида. Авторы предполагают, что синтез дополнительных молекул фаговых белков и продуктов их протеолиза, обладающих антимикробными свойствами, которые не входят в состав вирусной частицы, но высвобождаются во время лизиса бактериальных клеток, может способствовать распространению фаговой инфекции в бактериальной колонии. Эта гипотеза требует дополнительного экспериментального подтверждения, но с эволюционной точки зрения вполне логична.

Ключевым начальным процессом фаговой инфекции служит присоединение частицы фага к бактерии. Для этой цели фагам в качестве рецепторов могут служить различные участки липополисахаридов (LPS), белки капсул бактерий, жгутиков (флагелл), ресничек (фимбрий) и множество других разнообразных поверхностных белков бактерий. Кроме того, бактериофаги могут вводить в действие вспо-

могательные ферменты, чтобы разрушать бактериальную капсулу для достижения непосредственно клеточной стенки. Примерами таких ферментов могут служить эндосиалидаза бактериофага PKA1, разрушающая полисиаловую кислоту капсулы *Escherichia coli* K1 [31] и гиалуронанлиаза фага H4489A *S. pyogenes* [32]. Пока еще не идентифицированные вспомогательные полисахаридлиазы найдены в составе фагов *Klebsiella pneumoniae* и *Azotobacter vinelandii*.

Бактерии могут становиться устойчивыми к фаговой инфекции путем мутации или выброса гена рецептора фага. Нередко, однако, изменение рецепторного белка несет позитивный противобактериальный эффект. Приобретение устойчивости к фагу за счет потери одного из поверхностных белков может уменьшать жизнеспособность бактерии. Если же утраченный рецептор служит фактором вирулентности бактерии, то его потеря ведет к резкому уменьшению инфекционности микроорганизма [13].

Еще одной группой продуктов бактериофагов, представляющих собой интерес, являются бактериоцины – высокомолекулярные частицы, состоящие из фрагментов фагов и напоминающие по структуре их хвосты. В ряде работ описан эффект действия бактериоцинов, продуцируемых рядом грамотрицательных бактерий, преимущественно *Enterobacteriaceae* для уничтожения бактерий «извне» [33]. Недавно из культуры *Yersinia enterocolitica* был выделен бактериоцин энтероколитицин. Было показано, что он связывается с внешними гексасахаридами LPS некоторых серотипов *Y. enterocolitica*, формирует поры в клеточной стенке, вызывая отток ионов и, таким образом, убивает бактерии [34]. Однако испытание энтероколитицина для лечения инфекции, вызванной патогенной *Y. enterocolitica* O:3 у мышей, дало неоднозначные результаты [35], и на данный момент использование бактериоцинов в качестве антимикробных препаратов ограничено опытами *in vitro*.

В качестве «гибридной» технологии фаговой терапии следует упомянуть применение генетически модифицированного нерепликативного фага для борьбы с инфекцией *P. aeruginosa* у мышей [36]. Авторы удалили у нитчатого фага Pf3 ген белка экспорта и заменили его на ген эндонуклеазы рестрикции *Bgl*III. Мутантный фаг, инфицируя бактерию, начинает экспрессировать эндонуклеазу, разрушающую геномную ДНК хозяина (но не сам фаг, в ДНК которого соответствующие сайты отсутствуют), и, таким образом, убивает бактерию. Модифицированный Pf3 *in vitro* высвобождает намного меньшее количество эндотоксинов из бактерии по сравнению с фагом дикого типа и литическими фагами. Эксперименты *in vivo* на мышах

показали, что модифицированный фаг оказывает защитное действие даже при 3–5-кратной летальной концентрации бактерий [36].

IV. ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ БАКТЕРИОФАГОВ

Для любого бактериофага проникновение его нуклеиновой кислоты в клетку хозяина, а также выход из клетки вновь синтезированных фагов – необходимая составляющая жизненного цикла. Клеточная поверхность бактерий представляет собой сложноорганизованную и упорядоченную систему слоев, затрудняющих попадание чужеродных макромолекул внутрь бактериальной клетки. Для прокариот наиболее характерно наличие двухслойной (пептидогликан и клеточная мембрана у грамположительных бактерий) или трехслойной (наружная мембрана, пептидогликан и внутренняя мембрана у грамотрицательных бактерий) клеточной стенки [37, 38] (рис. 1). Наиболее труднопреодолимую преграду фагу на пути инфицирования представляет пептидогликановый слой. Он построен из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой посредством β -1,4-гликозидных связей (рис. 2). К N-ацетилмурамовой кислоте присоединен пептидный фрагмент, состоящий из нескольких аминокислот. Как

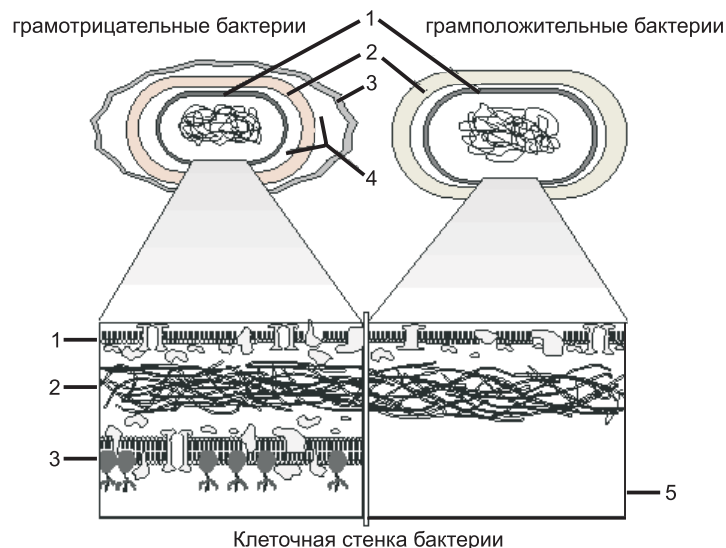


Рис. 1. Клеточная стенка грамотрицательных и грамположительных бактерий. 1 – цитоплазматическая мембрана, 2 – пептидогликан, 3 – наружная мембрана, 4 – периплазматическое пространство, 5 – внешняя среда [14].

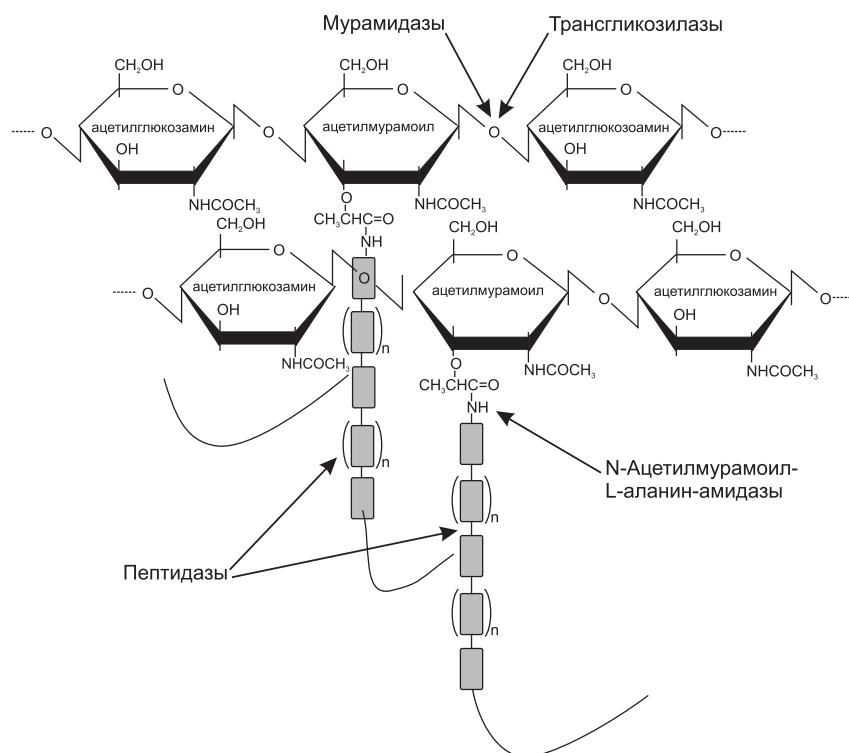


Рис. 2. Структура пептидогликана и литические ферменты бактериофагов, участвующие в ее деградации [10].

правило, именно различие в пептидной части обуславливает многообразие пептидогликанов различных видов бактерий. Сшитые между собой блоки пептидогликанов (муреин) образуют по существу единую гигантскую макромолекулу, которая определяет прочность пептидогликанового слоя и его непроницаемость для вирусных частиц и токсических факторов большой массы. Следовательно, для проникновения фаговой ДНК внутрь клетки фагу необходимо локально нарушить целостность не только клеточных мембран, но и пептидогликанового слоя.

Исходя из данных о структуре бактериальной клеточной оболочки, очевидно, что для ее разрушения должен быть использован комплекс ферментов с различной субстратной специфичностью. В англоязычной литературе такие ферменты получили общее название «lysins». Поскольку и по написанию, и по произношению это название

по-русски ассоциируется с аминокислотой лизином (lysine), в русскоязычной литературе часто используется термин «лизоцимы» – по первому открытому ферменту этого класса. Однако, как будет видно далее, собственно лизоцим и его действие являются лишь частным случаем структуры и каталитического механизма ферментов, разрушающих клеточную стенку. Исходя из этого, далее в обзоре мы будем использовать более общий термин «пептидогликан-лизирующие ферменты» (ПЛФ). Классификация и молекулярный механизм действия ПЛФ будут подробнее обсуждаться ниже. Вначале целесообразно остановиться на биологической роли этих ферментов на различных стадиях жизненного цикла вируса.

На рис. 3 представлен литический цикл развития бактериофага, который можно разбить на несколько этапов: 1 – связывание с рецепторами клетки; 2 – ограниченный лизис муреина пептидогликанового слоя и проникновение ДНК фага внутрь клетки бактерии (трансфекция); 3 – ингибирование синтеза белков хозяина и переключение на синтез собственных белков. В случае лизогенного пути развития вирусов происходит интеграция ДНК фага с геномом бактерии с последующим прекращением синтеза белков хозяина и началом собственного существования вируса при возникновении условий, обеспечивающих его целесообразность; 4 – регулирование собственного белкового синтеза; 5 – сборка вирусных частиц, лизис клеточной стенки бактерии и выход вирусных частиц из клетки.

Для проникновения в клетку бактерии и выхода из нее большинство бактериофагов, во всяком случае сложноорганизованные биологические частицы семейства *Caudovirales*, используют ПЛФ. В качестве такой атаки может быть рассмотрена наиболее хорошо изученная система взаимодействия грамотрицательных клеток *E. coli* и бактериофага T4 [39, 40]. Для проникновения внутрь клетки, окруженной наружной мембраной, пептидогликаном и внутренней мембраной, фагу необходимо преодолеть последовательно эти слои и осуществить перенос вирусной ДНК из головки фага внутрь цитоплазмы бактерии. Первоначально бактериофаг распознает своими длинными хвостовыми фибриллами LPS-рецепторы, расположенные на поверхности клетки, а затем необратимо связывается с ними короткими хвостовыми фибриллами. При этом происходит переход базальной пластинки из гексагональной в конформацию шестиконечной звезды, что, в свою очередь, приводит к сокращению хвоста бактериофага и проникновению хвостовой трубки сквозь мембрану [41]. Это проникновение осуществляется благодаря комплексу белков gp5 и gp27 базальной пластинки, который, проникая через внутреннюю

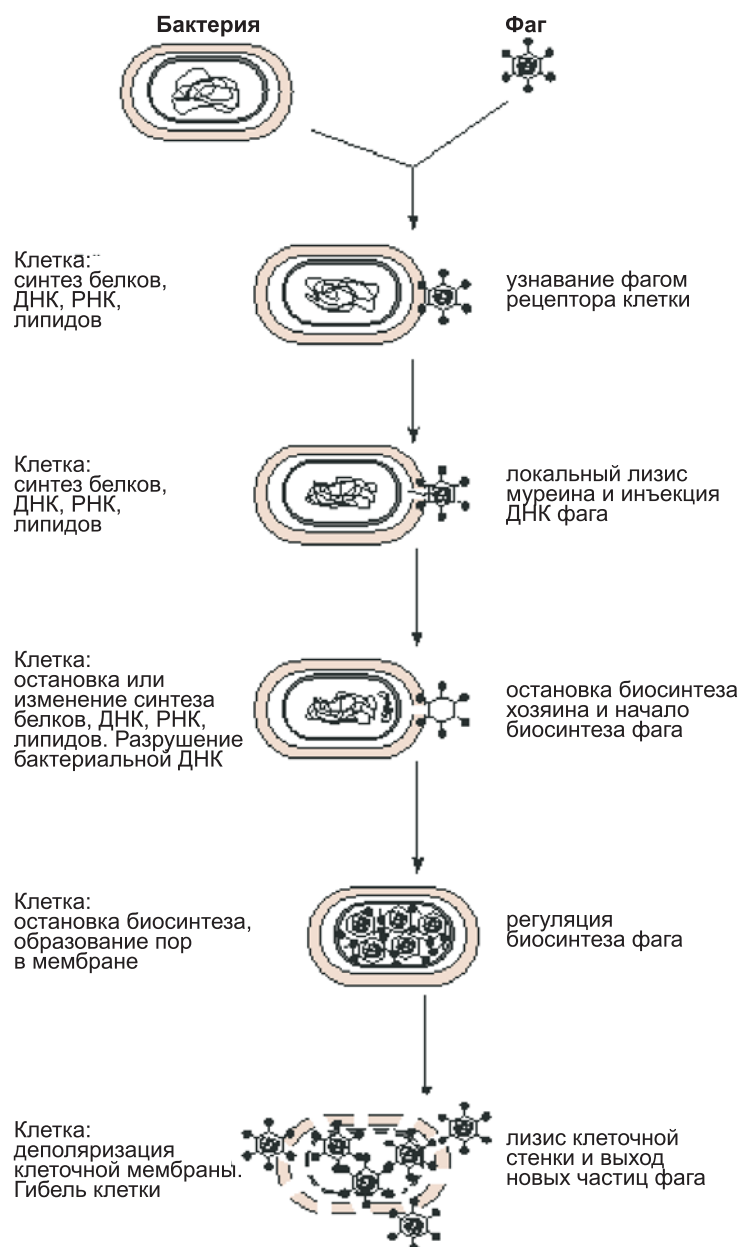


Рис. 3. Схематическое представление процессов, происходящих при фаговой инфекции бактерий [10].

мембрану бактерии, разрушает слой пептидогликана до степени, позволяющей ДНК фага оказаться внутри клетки. Gr5 – структурный белок, который содержит функциональный домен, обладающий свойствами ПЛФ [42–44].

После проникновения ДНК внутрь бактерии (трансфекции) фаг Т4 блокирует процессы репликации, транскрипции и трансляции хозяйской клетки (только несколько хозяйских белков, таких как РНК-полимераза и фактор регуляции транскрипции Rho, в дальнейшем используются фагом) и начинает синтез собственных белков, осуществляющих блокировку хозяйского белкового синтеза (белок Alc), разрушение хозяйской ДНК (белок Ndd) и др. [45]. Многие важные процессы жизнедеятельности бактерии подавляются (протеолиз) [46] или видоизменяются (синтез липидов) [47]. Этими изменениями обеспечивается защита белков фага от разрушения протеолитическими системами клетки хозяина и предотвращение повторной трансфекции бактериофагами из-за фактической утери рецепторных участков мембран. Кроме того, изменение липидного состава мембран повышает ее «хрупкость» и облегчает последующий выход фага из клетки.

Однако выход зрелых фаговых частиц невозможен до тех пор, пока не разрушен пептидогликановый слой, окружающий клетку. Для этих целей бактериофаг использует белок gre – собственный растворимый ПЛФ, который накапливается в клетках и до определенного момента не взаимодействует с клеточной стенкой. Взаимодействие белка gre с пептидогликаном становится возможным при экспрессии на поздних стадиях жизненного цикла фага белка gpt, который образует поры во внутренней мембране, окончательно нарушающие клеточный метаболизм, и регулирует конечный лизис клетки [48]. Далее ПЛФ gre разрушает пептидогликановый слой, и вновь образованные фаговые частицы высвобождаются из клетки-хозяина.

Действие бактериофага Т4 можно рассмотреть в качестве наиболее полного цикла клеточного лизиса, обеспеченного фактически только ферментами фага. Можно заметить, что при этом происходят 2 акта лизиса пептидогликанового слоя, описанные в классической работе Делбрюка [49] как «лизис извне» («lysis from without») и «лизис изнутри» («lysis from within»). «Лизис извне» ограничен в пространстве (рецептором фага на клетке и связанным ПЛФ фага) и во времени. Эти ограничения обусловлены тем, что вирусу для успешного осуществления своей стратегии размножения необходимо проникнуть в клетку, не убив ее при этом. Задействование ПЛФ, структурно не связанных с вирионом, затрудняет «лизис извне», так как

ставит бактериофаг в зависимость от диффузии ферментов, их взаимодействия с фагом в условиях многократного разбавления, а также скорости распада ПЛФ. Важным фактором является само положение участка лизиса, исключающее возможность глобального разрушения пептидогликана и, соответственно, немедленной гибели клетки-хозяина. Такая локализация обеспечивается за счет взаимодействия вириона со специфическим клеточным рецептором а также включением ПЛФ в составе вириона, либо его ассоциацией с мембраной фага (у фагов, имеющих мембрану).

«Лизис изнутри», в противоположность «лизису извне», не ограничен в пространстве, однако жестко ограничен во времени. Он осуществляется после масштабного синтеза растворимого ПЛФ в клетке и запускается одновременно с синтезом и встраиванием в мембрану специального регуляторного белка. Такие белки в международной литературе называются холинами (holin – от hole «дыра»). Однако, во избежание путаницы с более известным аминспиртом холином (choline), мы введем в обзор обозначение «мембрано-проникающий регуляторный белок лизиса» (РБЛ). Встраиваясь в мембрану, РБЛ не только образует поры, резко нарушающие метаболизм бактерии, но и способствует проникновению ПЛФ через внутреннюю мембрану бактерии к пептидогликановому слою. Это происходит по всей внутренней поверхности клетки, обеспечивая тем самым тотальный лизис пептидогликанового слоя с последующим разрушением клетки и выходом фаговых частиц наружу.

Существует математическая модель описания «лизиса изнутри» [50], которая учитывает ряд лимитирующих факторов – наличие РБЛ и связанный с ним задержанный лизис клеток из-за невозможности ПЛФ непосредственно контактировать с муреином клеточной стенки. Недостаток этой модели заключается в том, что клеточная стенка идеализированно рассматривается как твердое однородное тело без учета того, что пептидогликановый слой представляет собой сильно гидратированный «периплазматический гель» между внутренней и внешней мембраной.

«Лизис извне» и «лизис изнутри» сильно разнесены во времени. Если ранний «лизис извне» знаменует собой начало инфекции, то «лизис изнутри» – ее окончание. Между этими процессами должно пройти достаточно времени для синтеза вирусной нуклеиновой кислоты, белков и сборки бактериофага. Таким образом, синтез ПЛФ и поздний лизис клеток должны строго регулироваться геномом вируса.

Способов регулирования синтеза белков бактериофага довольно много. В качестве примера такой регуляции рассмотрим синтез белка

gre (растворимого ПЛФ) бактериофага Т4. Ген *e* фага Т4, кодирующий этот белок, транскрибируется как в раннем периоде инфекции, так и в ее поздней стадии [51]. Однако при ранней транскрипции продукт, соответствующий ПЛФ, не образуется, а синтезируется белок большего размера [52, 53]. Это объясняется образованием на ранней стадии транскрипции РНК с более устойчивой вторичной структурой на 5'-конце, что не позволяет синтезировать продукт из-за блокировки области Шайн-Дальгарно. На поздней стадии транскрипции промотор поздних генов образует РНК без формирования вторичной структуры и, таким образом, начинается синтез активного ПЛФ.

Помимо регуляции транскрипции существует регуляция пост-трансляционная, которая заключается в неспособности ПЛФ атаковать клеточную стенку без сигнала, обусловленного синтезом продукта поздних генов фага Т4 – РБЛ. Таким образом, наличие ступенчатая регуляция активности ПЛФ, определяющая точность и синхронность процесса лизиса клетки-хозяина с окончанием сборки фаговых частиц. Наличие РБЛ или схожего по функциям белка характерно для многих фагов. И хотя на данный момент в литературе не имеется однозначной информации о структуре РБЛ, по первичной последовательности эти белки подразделяются более чем на 35 семейств [54] и на 2 основных класса: I (содержащий 3 трансмембранных домена) и II (содержащий 2 трансмембранных домена) [55, 56] (рис. 4).

РБЛ кодируются блоком поздних генов фагов и накапливаются во внутренней клеточной мембране, осуществляя ее дестабилизацию [55–57]. Механизм действия РБЛ пока до конца не ясен. Его возможный вариант можно также подробно рассмотреть на примере фага Т4 [57]. В РБЛ-связанном лизисе бактериофагом Т4 клеток *E. coli*, помимо собственно ПЛФ *gre* и РБЛ *gpt*, участвует целый ряд продуктов генов фага (*gI*, *gIIA*, *gIIB*, *gIIC*, *gIV*) [46]. Несмотря на то, что РБЛ *gpt* бактериофага Т4 имеет весьма необычное строение (представлен всего одним трансмембранным доменом) [58, 59], он, по-видимому, как и канонические РБЛ, может образовывать поры. Для бактериофага Т4 был предложен также механизм ингибирования лизиса (LIN), в котором ключевую роль играет активируемый белок *gI*, локализованный в периплазме [60, 61]. За счет ряда конформационных изменений белок *gI* активируется, связывается с РБЛ и ингибирует его порообразующие свойства.

Таким образом, можно предположить следующий механизм образования пор: синтезированный РБЛ встраивается в клеточную мембрану и связывается с ингибитором (*gI* в случае фага Т4), который

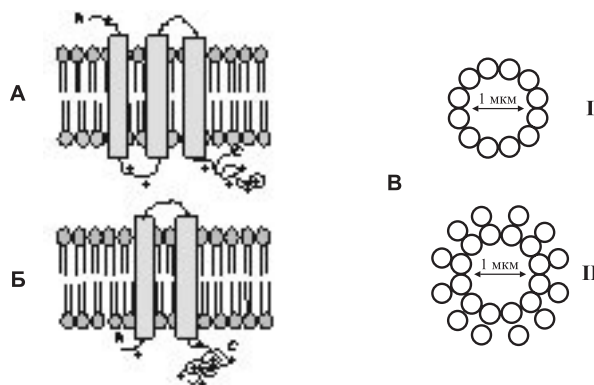


Рис. 4. Возможная мембранная топология регуляторных белков лизиса мембран (РБЛ) класса I и класса II, а так же стехиометрия гомоолигомерной «поры», образованной РБЛ I и II класса (III) [55].

предотвращает образование порообразной структуры. По-видимому, при этом может образовываться каналоподобная структура, которая не допускает проникновения в периплазму растворимого ПЛФ и крупных молекул, но при этом не препятствует движению ионов, которые вызывают деполяризацию мембраны. При накоплении достаточного количества РБЛ и ингибитора в мембране клетка становится неспособной поддерживать свой энергетический метаболизм. При этом РБЛ переходит из ингибированной формы в активную и участвует в образовании пор. Считается, что структура поры включает в себя 8–10 мономеров РБЛ и имеет диаметр около 5 нм. Такой размер поры как раз достаточен для прохождения через нее ПЛФ [58, 59].

По-видимому, для любого бактериофага желательно наличие двух ПЛФ: 1) связанного с вирионом и способного осуществлять ограниченный лизис – экзолизина или экзо-ПЛФ и 2) растворимого, осуществляющего полный лизис в комбинации с РБЛ – эндолизина или эндо-ПЛФ. Эта система описана для большинства известных хвостатых фагов.

Существуют также альтернативные системы проникновения и выхода фага из клетки. Так, описаны бактериофаги, имеющие всего один литический фермент. В этом случае можно предположить, что либо этот фермент может способствовать как интервенции фаговой ДНК, так и выходу фаговых частиц наружу за счет согласованной регуляции синтеза и действия фермента, либо фаг использует для проникновения и выхода бактериальные ПЛФ или транспортные механизмы клетки-хозяина. Также показано, что при мутациях генома

фагов, препятствующих синтезу эндо-ПЛФ, конечный лизис клетки-хозяина может осуществляться при помощи структурного экзо-ПЛФ, хотя и со значительно меньшей эффективностью [62].

Известны фаги, у которых полностью отсутствуют гены, кодирующие ПЛФ [63]. Такие фаги кодируют белки, способствующие образованию пор в мембране клетки хозяина, а регуляция ее автолиза осуществляется собственными ПЛФ. Например, бактериофаг Q β использует белок капсида A₂, который блокирует образование предшественника муреина, ингибируя фермент MurA [64]. Для фагов с подобной организацией цитолитической системы синтеза собственных ПЛФ не требуется. Однако такой вариант можно считать частным случаем, и в литературе нет четких данных о способах проникновения подобных фагов в клетку. Неизвестно также, увеличивает ли фаговая инфекция синтез бактериальных ПЛФ. Если фаг использует бактериальные ПЛФ для своего выхода из клетки, то должна наблюдаться гиперэкспрессия ПЛФ клетки-хозяина по сравнению с нетрансфицированными клетками. При обсуждении рассматриваемых механизмов следует учитывать, что организация цитолитической системы этих фагов недостаточно изучена, и может отличаться от описанной, а кроме того, не исключено, что существуют дополнительные фаговые ПЛФ, которые пока еще не обнаружены.

Возможна также и обратная ситуация, теоретически не оптимальная для эффективности работы цитолитической системы фагов. Для фага PRD1 установлено, что оба имеющиеся в его составе ПЛФ являются структурными белками [65]. Один из них, P15, связан с мембраной, окружающей капсид фага. По всей видимости, белок P15 – видоизмененная форма растворимого ПЛФ, который в процессе эволюции либо ассоциировался с мембраной, либо вошел в нее. Скорее всего, этот фермент не принимает участия в деградации пептидогликана при трансфекции и остается во внешней мембране. Другой структурный белок P7 с литической активностью разрушает пептидогликановый слой, способствуя таким образом доставке ДНК вируса в клетку хозяина. Однако в конце литического цикла P15 встраивается во внутреннюю мембрану бактерии и разрушает пептидогликановую оболочку изнутри, обеспечивая выход бактериофага наружу, оставаясь в состав мембраны, окружающей капсид фага. Не исключено также, что помимо функций ПЛФ P15 и/или РБЛ может обладать и функцией координирования образования мембраны фага PRD1 [66]. Наличие обоих ПЛФ – и большого структурного экзо-ПЛФ gp181, и небольшого эндо-ПЛФ gp144 в составе вирусной частицы, было обнаружено у гигантского

хвостатого фага фKZ [67]. В этом случае, видимо, играет роль полифункциональность *gp144*, субстратсвязывающий домен которого может участвовать в процессе узнавания рецепторов клеточной стенки при трансфекции бактерии фагом.

Таким образом можно видеть, что подробно описанная утилитарная схема применения бактериофагами ПЛФ двух типов и РБЛ – не универсальна. Имеется множество вариаций и исключений из этого правила. Вероятно, что по мере накопления сведений о цитолитических системах других бактериофагов будут обнаружены и другие функциональные схемы, оптимизированные для специфических клеток хозяев и морфологических типов фагов. Однако с точки зрения структуры ПЛФ и молекулярного механизма их действия разнообразие не так велико.

V. КЛАССИФИКАЦИЯ ПЕПТИДОГЛИКАНЛИЗИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящий момент существует несколько типов классификации ПЛФ [68–72]. Рассматривая гликозилгидролазы в целом, Энриссат и Байрох [68] отнесли ПЛФ вирусов к группам 22, 23 и 24 гидролаз. Анализируя эволюционное родство между ПЛФ, [70, 71] их подразделили на V(virus)-, G(goose)-, C(chicken)-, CH (chalaropsis)-типы, к которым недавно прибавился тип I (invertebrate)- [73]. ПЛФ вирусов бактерий [74] преимущественно относятся к V-типу (*gp*, *gp5* бактериофага T4), хотя известны также представители G-типа (*gp16* бактериофага T7 и P7 бактериофага PRD1) и CH-типа (*LysA* бактериофага MV1 и *Cpl* бактериофага Cp-1). В силу ряда особенностей, не характерных ни для одного из описанных классов, *gpR* бактериофага λ был выделен в подтип ПЛФ λ -типа. Путем исследования структуры и различных свойств ПЛФ фагов было показано, что ферменты типов V, G и частично λ имеют общие структурные элементы с ПЛФ C-типа (например, с лизоцимом из куриного яйца).

В настоящей работе мы подробно рассмотрим классификацию, основанную на химическом механизме действия ПЛФ. По способу связывания и расщепления субстрата литические ферменты бактериофагов подразделяются на: 1) лизоцимподобные мурамидазы КФ 3.2.1.17; 2) N-ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы КФ 3.5.1.28; 3) пептидазы КФ 3.4.17 [74], а также эстеразы КФ 3.1.1.2 [75]. Лизоцим-подобные литические ферменты гидролизуют β 1–4-связь между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамином в молекуле пептидогликана и подразделяются на мурамидазы и лити-

ческие трансглюкозилазы (рис. 2). В качестве примера мурамидаз можно привести ПЛФ – *gr e* бактериофага Т4, а трансглюкозилаз – *gr R* фага λ . N-Ацетилмурамоил-L-аланин-амидазы гидролизуют амидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином, а пептидазы – пептидную связь между аминокислотами пептидогликана. Примером амидазы может служить *gr15* бактериофага Т7, а пептидазы – ПЛФ фага ф6.

МУРАМИДАЗЫ

Белок *гре* (лизозим) бактериофага Т4 является типичным представителем мурамидаз. По результатам рентгеноструктурного анализа [76, 77] его молекула имеет размеры примерно $50 \times 30 \times 30$ Å и построена из 165 а.о. Она состоит из двух доменов, один из которых включает в себя спиральные участки и три антипараллельных β -слоя, а другой – только спиральные фрагменты вторичной структуры (рис. 5). Между собой домены соединены длинным спиральным участком (20 а.о.). Таким образом, примерно 70% от общего числа аминокислотных остатков вовлечено в регулярные структуры – около 60% образуют спиральные участки, а около 16 остатков формируют β -слой. *Гре* имеет высокую степень гомологии с лизоцимом из яйца курицы и, по-видимому, одинаковый механизм действия [77].

Лизоцим из яйца курицы – первый фермент, пространственная структура которого была определена с помощью рентгеноструктурного анализа [78]. На примере этого типичного и наиболее изученного лизоцима можно рассмотреть механизм действия мурамидаз.

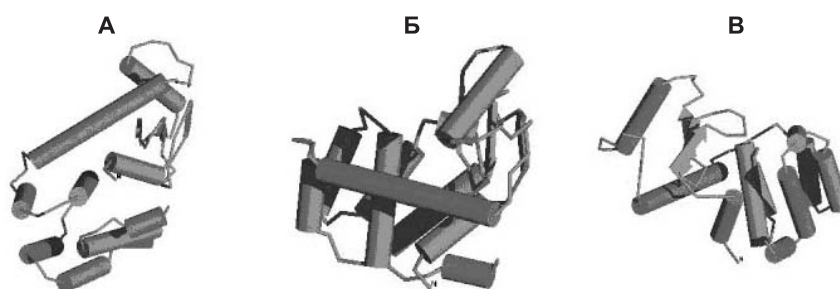


Рис. 5. Структура пептидогликанлизирующего фермента *гре* бактериофага Т4.

А – вид сбоку (вертикальная проекция), Б – вид сверху, В – вид сбоку (горизонтальная проекция) [77]. α -спирали показаны в виде цилиндров, β -тяжи в виде плоских стрелок.

На первой стадии ферментативной реакции происходит связывание фермента с субстратом, представляющим собой олигосахарид, содержащий 6 остатков, которые нумеруются А:F либо 4:-2. Субстрат связывается при помощи множества электростатических взаимодействий в искаженной конформации, при этом сахарный остаток в позиции –1 находится в конформации полукресла. Следствием этого является образование петли между остатками сахаров в положениях между +1 и –1.

Филлипс [79] предложил следующий механизм катализа (рис. 6Б): остаток аминокислоты каталитического центра Glu³⁵ протонирует кислород гликозила, в то время как нуклеофильный остаток аминокислоты Asp⁵² стабилизирует образующийся карбокатион посредством электростатических взаимодействий. После образования интермедиата свободный олигосахаридный фрагмент диффундирует из активного участка, замещаясь нуклеофильной молекулой воды. Молекула воды связывается с С1- атомом интермедиата с помощью отрицательного заряда Glu³⁵, действующего как основание. Присоединение молекулы воды происходит стереоселективно, с образованием только β-связи, так как со стороны α- находится остаток Asp⁵², стабилизирующий переходное состояние.

Кошланд [80] предложил альтернативный механизм каталитической реакции, представленный на рис. 6А. Отличие от описанного выше механизма состоит в том, что предполагается образование интермедиата, ковалентно связанного с ферментом через остаток аминокислоты Asp⁵². Обе теории, объясняющие возможный механизм реакции, существуют параллельно уже много лет, однако до сих пор исследователи не пришли к единому мнению [81, 82].

ЛИТИЧЕСКИЕ ТРАНСГЛИКОЗИЛАЗЫ

В соответствии с нюансами структуры литические трансгликозилазы бактерий и бактериофагов подразделяют на 4 семейства. К первому семейству относятся гликозилазы Slt, MltC, EmtA, YfhD, MltD из *E.coli* (которые имеют высокое родство с ПЛФ G-типа, и, в свою очередь, подразделяется на 5 подсемейств), ко второму относится трансгликозилаза MltA из *E. coli*, к третьему – MltB из *E. coli*, а к четвертому – ПЛФ бактериофага λ [69].

Типичным представителем литических трансгликозилаз является белок gpR бактериофага λ [83] (рис. 7А). Его кристаллическая структура образована тремя независимыми молекулами, названными А, В и С. Структуры молекул А и С очень схожи, в то время как молекула В имеет значительные отличия в области с 51 по 60 и с 128 по 141 а.о.

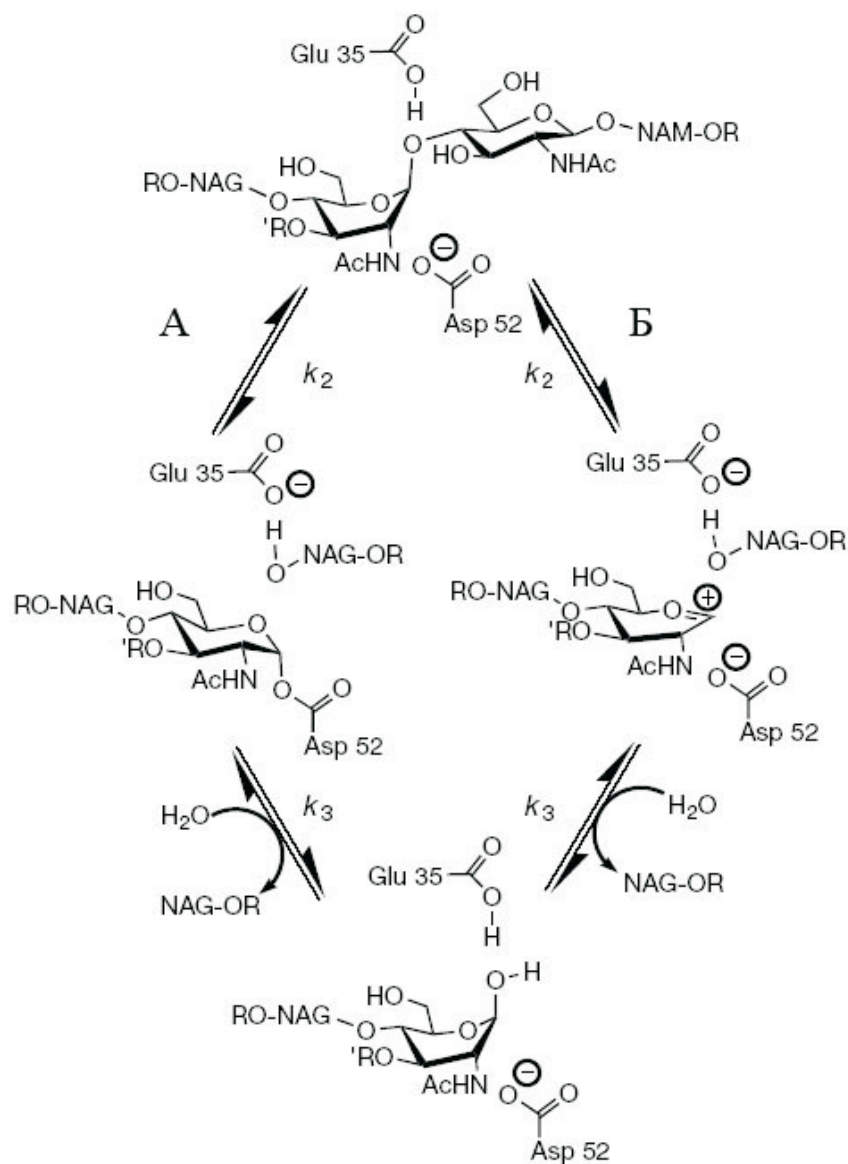


Рис. 6. Возможные пути каталитического механизма расщепления пептидогликана мурамидазами: А – механизм Кошланда [80]; Б – механизм Филлипса [79].

Ас – ацетил, R – олигосахарид, R' – пептидная часть, NAM – N-ацетилмурамоил, NAG – N-ацетилглюкозамин.

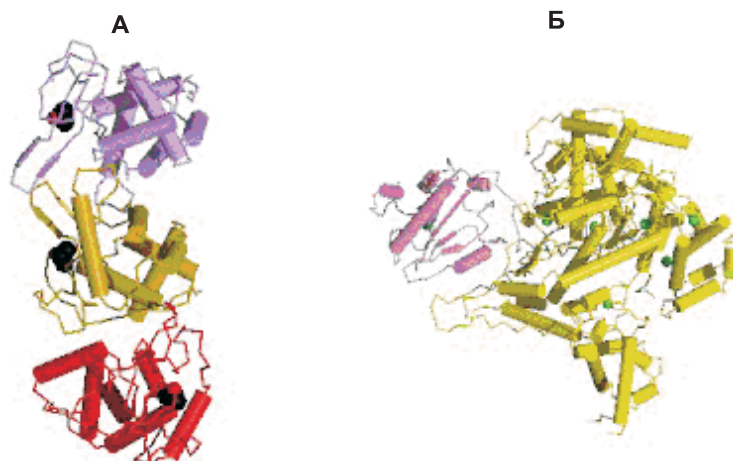


Рис. 7. Структура ПЛФ бактериофага λ (тример) (I) и комплекса ПЛФ бактериофага T7 с T7-РНК-полимеразой (III) [83].

α -спирали показаны в виде цилиндров, β -тяги в виде плоских стрелок.

Сравнение *grR* фага λ с лизоцимами из яйца курицы и из бактериофага T4 показывает, что, несмотря на некоторое сходство с лизоцимами С-типа (короткая спираль, связывающая 2 домена в молекуле *grR* λ , и наличие консервативных β -слоев как в лизоциме С-типа, так и в ПЛФ фага λ), *grR* λ отличается от других лизоцимов [84].

Каталитический механизм трансгликозилаз можно рассмотреть на примере фермента *E. coli* MltB, имеющего высокую степень гомологии с *grR* бактериофага λ [85]. Основным отличием трансгликозилаз от мурамидаз является отсутствие у них нуклеофильного каталитического остатка, такого как Asp⁵² у лизоцима из яйца курицы (см. выше). Различия также проявляются в существовании сайтов связывания олигосахарида в позициях +1 и +2. Первая стадия реакции – образование оксокарбониевого катиона – протекает так же, как в случае мурамидазы и катализируется остатком Glu¹⁶². На второй стадии реакции происходит внутримолекулярная нуклеофильная атака С6-гидроксидом С1-атома углерода оксокарбониевого катиона. Для такой атаки необходимо, чтобы остаток сахара находился в конформации ванны с С5-гидроксиметильной группой в аксиальном положении. Именно в такой конформации происходит сближение С6-гидроксильной группы и С1- атома углерода и возможна нуклеофильная атака. При этом каталитический остаток Glu¹⁶² активирует С6-гидроксил, оттягивая на себя протон гидроксила. Стабилизация

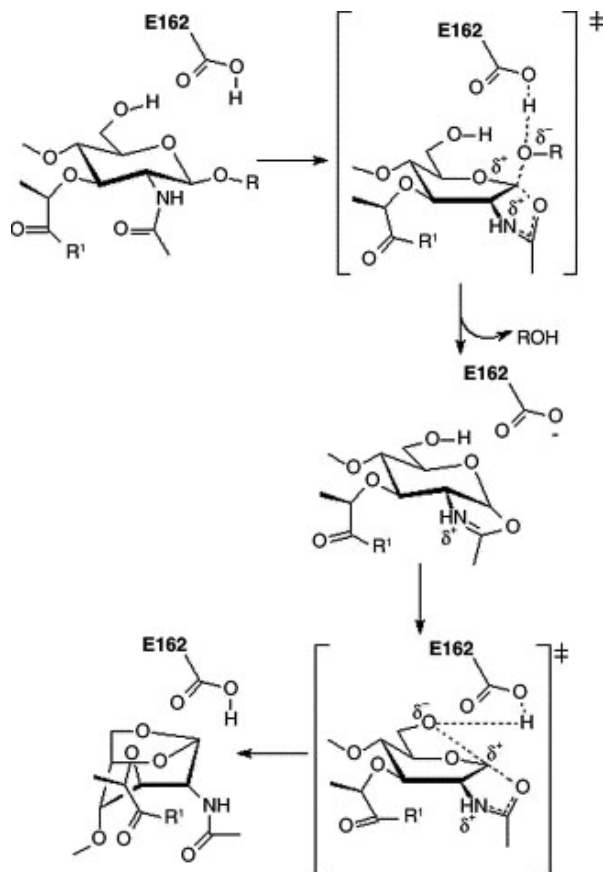


Рис. 8. Реакция расщепления пептидогликана трансгликозилазой MtlB.

Остаток Glu162 служит для протонирования гликозидной связи с последующим образованием промежуточного мурамилокскарбониевого катиона. R – олигосахарид, R' – пептидная часть [85].

оксокарбониевого катиона возможна и путем взаимодействия с карбонильным кислородом N-ацетильной группы субстрата (рис. 8).

Взаимодействие N-ацетильной группы N-ацетилглюкозамина с координирующими остатками Arg¹⁸⁷ и Arg¹⁸⁸ активного центра позволяет переходному состоянию принять такую конформацию, при которой карбонильный атом кислорода оказывается сближенным с C1-атомом сахарного остатка. В таком положении оксокарбониевый катион стабилизируется за счет электростатического взаимодействия

положительного заряда С1-атома с частично отрицательным зарядом карбонильного кислорода, что, соответственно, ведет к стабилизации переходного состояния в целом. Кроме того, карбонильный кислород защищает С1-атом от возможной атаки молекулой воды с α -стороны. Существует теория, согласно которой между карбонильным кислородом и С1-атомом образуется ковалентная связь и, соответственно, возникает переходное состояние с оксазаноновым циклом [86]. Однако это предположение пока недостаточно подтверждено экспериментально.

Внутримолекулярная нуклеофильная атака может протекать при более коротком времени жизни оксокарбониевого катиона и, соответственно, меньшей степени стабилизации переходного состояния. Этим объясняется отсутствие нуклеофильного каталитического остатка у трансглюкозилаз [87].

N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛ-L-АЛАНИН-АМИДАЗЫ

Эти ферменты гидролизуют связь между N-ацетилмурамовой кислотой и L-аланином пептидного хвоста. Наиболее хорошо изученным ферментом данного типа является ПЛФ (gr 3.5) бактериофага Т7, структура которого определена с разрешением 2,2 Å [88]. Gr3.5 фага Т7 – бифункциональный Zn-ассоциированный белок, который помимо амидазной активности обладает способностью ингибировать транскрипцию, осуществляемую с помощью Т7-РНК-полимеразы [89].

Молекула gr 3.5 фага Т7 имеет размеры $46,5 \times 62,5 \times 110$ Å и состоит из 5 β -слоев (4 параллельных и 1 антипараллельный) и трех α -спиралей (рис. 7Б). ПЛФ связывает ион Zn^{2+} за счет His¹⁷, His²² и Cys¹³⁰ и через молекулу воды с остатком Tyr⁴⁶. Атом цинка необходим для осуществления амидазной активности, но не требуется для ингибирования Т7 РНК-полимеразной активности [90]. Сравнение gr 3.5 фага Т7 с gr фага Т4 и лизоцимом из яйца курицы показало различие в структуре этих белков.

Структура каталитического центра и механизм действия gr 3.5 фага Т7 имеют определенное сходство с двумя Zn^{2+} -протеазами: термолизином и карбоксипептидазой А. Остатки His¹²², Cys¹³⁰, His¹⁷ ПЛФ фага Т7, являющиеся лигандами Zn^{2+} , соответствуют остаткам His⁶⁹, Glu⁷², His¹⁹⁶ карбоксипептидазы А и остаткам Glu¹⁶⁶, His¹⁴⁶, His¹⁴² термолизина. В свою очередь, Tyr⁴⁶ соответствует остатку отрицательно заряженной аминокислоты (Glu²⁷⁰ карбоксипептидазы А и Glu¹⁴³ термолизина), а Lys¹²⁸ – остатку положительно заряженной аминокислоты (Arg¹²⁷ карбоксипептидазы А и His²³¹ термолизина). Каталитический механизм данной реакции включает в себя три основные стадии [88] (рис. 9):

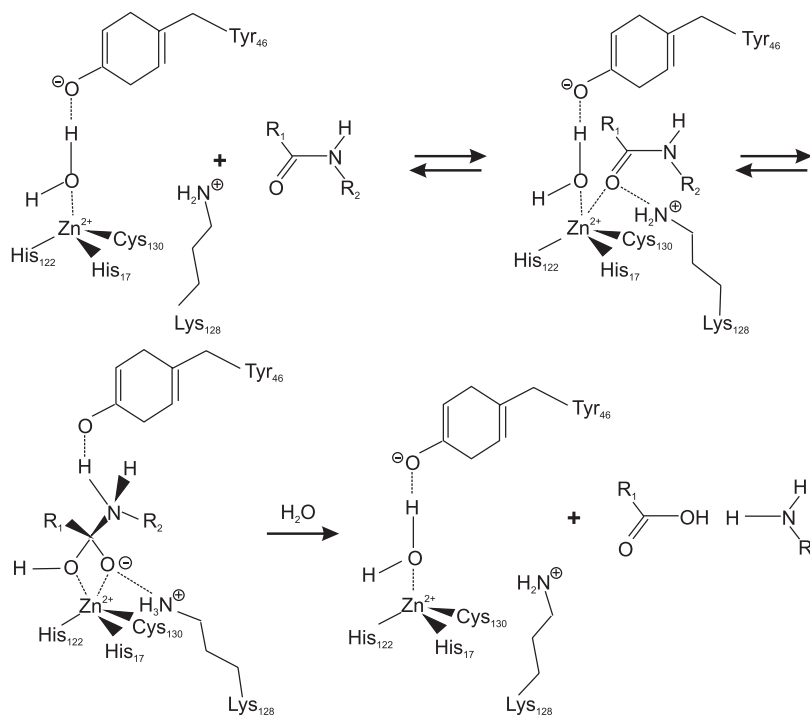


Рис. 9. Реакция расщепления боковой цепи пептидогликана амидазой бактериофага T7.

R1 – ацетилмуравовая кислота, R2 – пептидная цепь (в цитированной работе – трипептид L-аланил-γ-D-глутамил-мезо-диаминопимелил-D-аланин) [88].

1. Взаимодействие положительно заряженного остатка Lys¹²⁸ с карбонильным атомом кислорода субстрата.

2. Нуклеофильная атака молекулой воды, активированной Zn²⁺ и отрицательно заряженным остатком Tyr⁴⁶.

3. Диссоциация переходного комплекса и переход протона на уходящую аминогруппу.

Каталитическая роль фермента в основном заключается в увеличении лабильности пептидной связи путем поляризации двойной связи карбонильной группы и обеспечении перехода атома углерода в sp³-состояние. Это приводит к уменьшению π-делокализации пептидной связи, что, в свою очередь, ведет к удлинению связи и, соответственно, к увеличению основности азота. Таким образом, и азот, и углерод пептидной связи становятся более реакционноспособными по отношению к молекуле воды [90].

ПЕПТИДАЗЫ

Пептидазы гидролизуют пептидную связь между аминокислотами пептидного «хвоста», присоединенного к ацетилмурамиловым группам пептидогликана. Типичным представителем пептидаз является белок Р5 из бактериофага ф6, обладающий широким спектром литической активности по отношению к грамотрицательным бактериям [91]. Этот класс цитолитических ферментов является самым малочисленным. Возможно, именно поэтому пептидазы мало изучены – до сих пор неизвестны ни их структура, ни механизм действия. Для белка Р5 было установлено, что он имеет «лизоцимподобную» третичную структуру, а некоторые структурные мотивы имеют высокую степень гомологии с литическими трансгликозилазами, а также с ПЛФ С-, V- и G-типа [92].

**VI. МОДУЛЬНОЕ СТРОЕНИЕ
ПЕПТИДОГЛИКАНЛИЗИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ**

В 1990 г. при изучении аутолитических ферментов пневмококков *S. pneumoniae* Диас с сотр. [93] обнаружили закономерность модульного строения большинства из них. Один домен узнает РБЛ, ассоциированные с клеточной стенкой, определяя таким образом место будущего лизиса, а другой, содержащий активный центр гидролазы (мурамидазы, глюкозаминидазы и т.п.), фактически производит расщепление пептидогликанов. Генно-инженерные эксперименты по комбинированию и перестановке функциональных доменов подтвердили эту теорию [94, 95]. В дальнейшем модульное строение было обнаружено как у новых, так и у ранее открытых ПЛФ из различных источников, в том числе и бактериофагов [95–99].

В ряде случаев к одному связывающему домену могут присоединяться два и более каталитических домена [99]. Наличие же домена связывания обеспечивает субстратную специфичность ПЛФ. В целом, при сравнении литических ферментов одного класса из разных фагов было показано, что каталитические домены у них имеют довольно высокую гомологию, в то время как область связывания неконсервативна [100].

У ПЛФ фагов грамположительных бактерий каталитический домен обычно находится в N-концевой области полипептидной цепи, а домен узнавания – в С-концевой [97]. У фагов грамотрицательных бактерий подобная закономерность не столь четко выражена [98]. Например, эндо-ПЛФ gp144 бактериофага фKZ *P. aeruginosa* имеет N-концевое расположение участка связывания с пептидогликанами [67]. А некоторые эндо-ПЛФ имеют очень малый размер, и дополнительные

домены, отвечающие за связывание с пептидогликановым субстратом или предварительно внедрившимися в клеточную стенку РБЛ, в них не обнаружены.

В силу структурной дискретности строения ПЛФ бактериофагов возможно создание химерных ферментов с измененной специфичностью к субстрату и иным механизмом действия. На примере литических ферментов фагов *S. pneumoniae* это было экспериментально продемонстрировано [100]. *De novo* сконструированный ПЛФ узнавал тот же самый участок клеточной стенки пневмококков, но расщеплял иную связь пептидогликана.

Недавно была установлена полная кристаллическая структура модульного ПЛФ Crp1–1 [97] в свободном и ассоциированном с РБЛ состояниях. Из полученных данных можно предположить, что после связывания домена узнавания с РБЛ происходит конформационная перестройка, обеспечивающая оптимальную для расщепления пептидогликанов ориентацию активного центра. Это является одним из доказанных примеров регуляции активности ПЛФ. Другим примером регуляции служит наличие в генах некоторых фагов интронов, например, интрона группы I у ПЛФ фагов *Staphylococcus thermophilus* [101] и бактериофага *K. S. aureus* [102]. Сплайсинг и синтез активной формы фермента начинаются только после получения соответствующего молекулярного сигнала [101, 102].

Высокодифференцированная мультимодульная организация характерна для экзо-ПЛФ, т.е. ПЛФ, осуществляющих «лизис снаружи» на первом этапе фаговой инфекции. Нередко экзо-ПЛФ входят в состав сложных многобелковых комплексов и в процессе инфицирования претерпевают конформационные и протеолитические изменения. К настоящему времени хорошо изучен лишь комплекс экзолитических белков gr5 и gr27 бактериофага T4 [40]. Эти белки входят в состав средней втулки базальной пластинки [42, 44]. Gr5 содержит каталитический домен, участвующий в разрушении пептидогликанового слоя клеточной стенки снаружи [43]. Структура активного центра фермента gr5 ~ на 40% гомологична активному центру цитоплазматического ПЛФ фага T4, кодируемого геном *e* [103], причем функциональные аминокислотные остатки Glu¹¹, Asp²⁰ и Thr²⁶ у gr5 и Glu¹⁸⁴, Asp¹⁹³ и Thr¹⁹⁹ у gr5 полностью идентичны. Соответственно, можно предположить, что по механизму действия оба ПЛФ бактериофага T4 относятся к мурамидазам. После встраивания в базальную пластинку gr5 подвергается автокаталитическому расщеплению между остатками Ser³⁵¹ и Ala³⁵². Обе части – N-(gr5*) и C-концы (gr5C) – остаются связанными с частицей вируса [44].

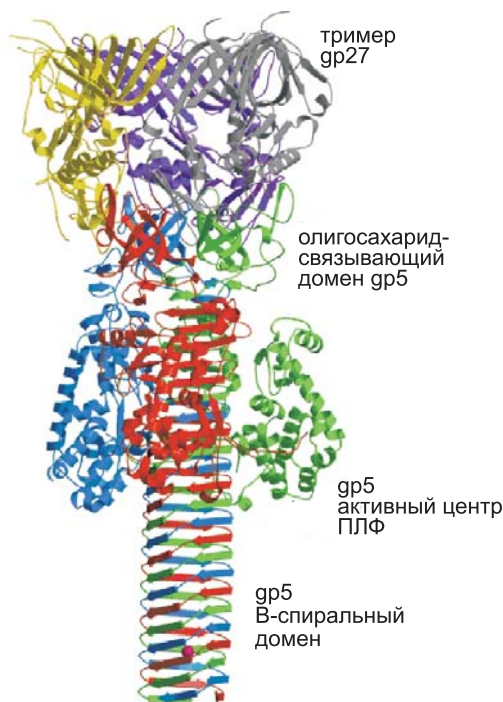


Рисунок 10. Структура комплекса белков gp5–gp27 бактериофага Т4 [40].
α-спирали показаны в виде спиралей, β-тяжи в виде плоских стрелок.

Таким образом, комплекс gp5–gp27 состоит из девяти полипептидных цепей – $(gp27-gp5^*-gp5C)_3$.

Структура комплекса gp5–gp27, определенная с разрешением 2,9 Å [42] (рис. 10), представляет собой факелоподобную конструкцию высотой 190 Å, в которой тример gp27 расположен сверху. Три мономера gp27 собраны в полый цилиндр с внутренним и внешним диаметрами 30 и 80 Å, соответственно, которые окружают N-концевые домены gp5* с присоединенным доменом gp5C. Тример gp5C SDS-устойчив, и C-концевые части трех цепей gp5C, содержащие 11 октапептидных повторов ValXGlyXXXXX, свернуты в жесткую β-спиральную призму, а домены лизоцима окружают N-конец призмы.

Мономер gp5* содержит два домена: N-концевой домен и активный центр ПЛФ. N-Концевой β-структурный домен (остатки 1–129) образует самостоятельную третичную структуру (фолд) и содержит сайт связывания олигосахаридов [104], который обеспечивает взаи-

модействие с пептидогликановым слоем. Активный центр ПЛФ расположен на периферии центральной β -спирали. Активация ПЛФ в структуре $(gp5^*-gp5C)_3$ происходит после диссоциации комплекса.

Механическое воздействие сокращения чехла передается через комплекс $gp27$ –(N-концевой домен $gp5$) на жесткую β -спиральную молекулярную «иглу», которая прокалывает внешнюю мембрану. По мере сокращения чехла игла проходит на глубину ~ 40 Å, углубляя пору в мембране. При контакте с пептидогликановым слоем игла отщепляется от конца стержня, что активирует $gp5$ -ПЛФ, который локально разрушает клеточную стенку, позволяя стержню войти в контакт с цитоплазматической мембраной. Тример $gp27$, находясь на конце стержня, вероятно, взаимодействует с рецепторами на цитоплазматической мембране, что инициирует выход ДНК из капсида и проникновение ее в клетку по каналу стержня [40–42].

Парадоксальный, на первый взгляд, способ механического проникновения через клеточную стенку специальным доменом экзо-ПЛФ с целью оптимизации положения активного центра, очевидно, достаточно широко распространен у бактериофагов. Косвенно это подтверждается наличием у некоторых экзо-ПЛФ термостабильных доменов, обладающих, по-видимому, повышенной жесткостью [44, 105, 106].

VII. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЭНЗИБИОТИКОВ, ОГРАНИЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Интенсивное исследование литических ферментов бактериофагов привлекло внимание клиницистов к их апробации в качестве лечебных агентов. В обращение был введен термин «энзибиотики» (ферментативные антибиотики, как правило, фагового происхождения) [100]. Было установлено, что ПЛФ PlyG, полученный из фага γ *Bacillus anthracis*, способен лизировать как взрослые клетки, так и споры *B. anthracis* [107]. Добавление ПЛФ стрептококкового бактериофага вызывает быстрый лизис клеток стрептококков групп А (*S. pyogenes*) [108] и В (*S. agalactiae*) [109], а также защищает мышей от развития инфекции при заражении их стрептококками [110].

Наиболее интересное свойство литических ферментов – их способность убивать только те виды или подвиды бактерий, против которых направлены фаги-источники выделенных ПЛФ. Например, ПЛФ фагов стафилококков убивают стафилококки, а ферменты пневмококковых фагов – пневмококки [110–112]. Таким образом, в отличие от антибиотиков, большинство из которых имеют широкий спектр действия и уничтожают практически все бактерии, присутствующие в организме пациента, ПЛФ могут убивать только

патогенные микроорганизмы, практически без токсического эффекта по отношению к нормальной симбиотической микрофлоре.

Для ПЛФ фагов грамположительных бактерий (например, пневмококков) при использовании двух ПЛФ с разными механизмами действия наблюдается существенный синергический эффект: при их одновременном применении эффективность уничтожения бактерий повышается [111–114]. В этом случае уменьшается и опасность появления ферментоустойчивых мутантов. Синергизм действия также отмечен при использовании ПЛФ в комбинации с синтетическими антибиотиками [115, 116]. Например, сочетание ПЛФ Cpl-1 и пенициллина или гентамицина приводило к полному уничтожению пневмококков пенициллинустойчивого штамма [116]. Таким образом, правильно подобранная комбинация ферментов и низкомолекулярных антибиотиков может подавлять многие штаммы патогенных микроорганизмов, устойчивые к антибиотикам.

Однако выявился и ряд ограничений на использование ПЛФ. Имеющиеся данные свидетельствуют об относительно эффективном действии энзимов лишь против грамположительных бактерий. Это обусловлено строением их клеточной стенки, не препятствующем контакту ПЛФ с углеводами и пептидогликанами клетки снаружи, в то время как у грамотрицательных бактерий внешняя мембрана снижает эффективность ПЛФ почти до нулевого уровня [112, 113].

При обсуждении перспектив терапевтического использования ПЛФ бактериофагов потенциальное беспокойство вызывает опасность выработки нейтрализующих антител. В отличие от антибиотиков, которые в подавляющем большинстве – неиммуногенные малые молекулы, ферменты могут стимулировать иммунный ответ при эпизодическом и систематическом приеме. Для изучения этого вопроса исследовалось влияние гипериммунной кроличьей сыворотки против ПЛФ фагов пневмококков, сибирской язвы и *S. ruo-genes* на антибактериальный эффект ферментов [112–114]. Было показано, что *in vitro* и *in vivo* антитела замедляют, но не полностью блокируют лизис бактериальных клеток. Отчасти этот эффект объясняется тем, что аффинность ПЛФ к своим субстратам может быть выше, чем антитела к ферменту. Подобно другим белкам, вводимым внутривенно животным и человеку, фаговые белки имеют короткий период полураспада (около 15 мин, [110]). Однако в случае грамположительных бактерий ПЛФ осуществляют свое действие очень быстро и за отведенный промежуток времени успевают оказать терапевтический эффект. [111, 113]. Но даже в этом случае для излечения от инфекции требуются множественные инъекции или постоянная инфузия фермента в организм в течение некоторого времени [112].

Литические ферменты фагов можно использовать как новое средство борьбы с бактериальными патогенами. Впервые появилась возможность подавлять патогенные микроорганизмы в организме человека, не затрагивая нормальную флору. Уже изученные ПЛФ бактериофагов вполне перспективны для использования против устойчивых к антибиотикам грамположительных бактерий в тех местах, где это является серьезной проблемой – больницах, роддомах, ожоговых центрах и богадельнях. Многие из выделенных ПЛФ выдерживают температуру до 60°C и сравнительно несложны для производства в больших количествах [44, 105, 106, 114].

В прикладном аспекте основная задача на будущее – совершенствование стратегии применения фаговых ПЛФ. Белковая инженерия и направленный мутагенез могут способствовать разработке новых ПЛФ, наиболее активных в каждом конкретном случае. Считается, что число разновидностей фагов на Земле составляет около 10^{31} , и на сегодня известна лишь ничтожная часть из них. Поэтому вероятность открытия новых ПЛФ, в том числе эффективных и против грамотрицательных бактерий, очень велика. Таким образом, есть надежда, что в обозримом будущем благодаря внедрению новых фаговых ПЛФ и дальнейшему развитию фаговой терапии будет решена проблема борьбы с патогенными штаммами бактерий, устойчивых к низкомолекулярным антибиотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Merrill, C.R., Scholl, D., and Adhya, S. (2003) *Nature reviews*, **2**, 489–497.
2. Fischetti V.A. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 734–735.
3. D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., and Wright, G.D. (2006) *Science*, **311**, 374–377.
4. Ackermann, H.-W. (2000) *Arch. Virol.*, **146**, 843–857.
5. Maniloff J., and Ackermann H.-W. (1998) *Arch. Virol.*, **143**, 2051–2063.
6. Bruyogne, R., and Maisin, J. (1921) *C.R. Soc. Biol.*, **85**, 1120–1121.
7. D'Herelle, F. «The bacteriophage and its behavior» (Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1926, с. 490–541.
8. Summers, W.C. (2001) *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 437–451.
9. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J.G.Jr. (2001) *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **45**, 649–659.
10. Stone, R. (2002). *Science*, **298**, 728–731.
11. Barrow, P.A., and Soothill, J.S. (1997) *Trends. Microbiol.*, **5**, 268–271.
12. Inal, J.M. (2003) *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **51**, 237–244.
13. Levin, B.R., and Bull, J.J., (2004) *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 166–173.
14. Clark, J.R., and March, J.B. (2004) *Expert Rev. Vaccines*, **3**, 463–476.
15. Projan, S. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 167–168.
16. Skurnik, M., and Strauch, E. (2006) *Int. J. Med. Microbiol.*, **296**, 5–14.
17. Thiel, K. (2004). *Nat. Biotechnol.*, **22**, 31–36.

18. Brussow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.D. (2004). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 560–602.
19. Mesyanzhinov, V.V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V.A., Bourkaltseva, M.V., Sykilinda, N.N., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2002) *J. Mol. Biol.*, **317**, 1–19.
20. Krylov, V., Pleteneva, E., Bourkaltseva, M., Shaburova, O., Volckaert, G., Sykilinda, N., Kurochkina, L., and Mesyanzhinov, V. (2003) *Res Microbiol.*, **154**, 269–275.
21. Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2005) *J Mol Biol.*, **354(3)**, 536–545.
22. Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 35–42.
23. Broudy, T.B., and Fischetti, V.A. (2003) *Infect. Immun.*, **71**, 3782–3786.
24. Merrill, C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., and Adhya, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3188–3192.
25. Payne, R.J., and Jansen, V.A. (2003) *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 315–325.
26. Lehrer, R.I., and Ganz, T. (1999) *Curr. Opin. Immunol.*, **11**, 23–27.
27. Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, D., and Dziarski, R. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281(9)**, 5895–5907.
28. Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arroume, N., Krier, F., Chihib, N.E., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., and Guillochon, D. (2005) *Peptides*, **26(5)**, 713–719.
29. Reddy, K.V.R., Yedery, R.D., and Aranha, C. (2004) *Int. J. Antimicrob. Agents*, **24**, 536–547.
30. Rotem, S., Radzishovsky, I., Inouye, R.T., Samore, M., and Mor, A. (2006) *Peptides*, **27**, 18–26.
31. Pelkonen, S., Aalto, J., and Finne, J. (1992) *J. Bacteriol.*, **174(23)**, 7757–7761.
32. Baker, J.R., Dong, S., and Pritchard, D.G. (2002) *Biochem. J.*, **365**, 317–322.
33. Daw, M.A., and Falkner, F.R. (1996) *Micron*, **27**, 467–479.
34. Strauch, E., Kaspar, H., Schaudinn, C., Dersch, P., Madela, K., Gewinner, C., Hertwig, S., Wecke, J., and Appel, B. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5634–5642.
35. Damasko, C., Konietzny, A., Kaspar, H., Appel, B., Dersch, P., and Strauch, E. (2005) *J. Vet. Med. B.*, **52**, 1–9.
36. Hagens, S., Habel, A., Von Ahsen, U., Von Gabain, A., and Blasi, U. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3817–3822.
37. Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63(1)**, 174–229.
38. Beveridge, T.J. (1999) *J. Bacteriol.*, **181(16)**, 4725–4733.
39. Goldberg, E., Grinius, L., and Letelier, L. in «Molecular Biology of Bacteriophage T4» J.D. Karam ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (1994), 347–356.
40. Mesyanzhinov, V.V. (2004) *Adv. Virus Res.*, **63**, 287–352.
41. Leiman, P.G., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V.V., and Rossmann, M.G. (2004) *Cell*, **118**, 419–429.
42. Kanamaru, S., Leiman, P.G., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., and Rossmann M.G. (2002) *Nature*, **415**, 553–557.
43. Nakagawa, H., Arisaka, F., and Ishii, S. (1985) *J. Virology*, **54**, 460–466.
44. Kanamaru, S., Glassner, N.C., Ye, N., Takeda, S., and Arisaka, F. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 2739–2744.
45. Kutter, E., Guttman, B. and Carlson, K. «Molecular Biology of Bacteriophage T4» J.D. Karam ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (1994), 343–346.

46. Simon L.D. in «Molecular Biology of Bacteriophage T4» J.D. Karam ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (1994), 382–384.
47. Harper, D., Eryomin, V., White, T. and Kutter, E. in «Molecular Biology of Bacteriophage T4» J.D. Karam ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (1994), 385–390.
48. Abedon, S. in «Molecular Biology of Bacteriophage T4» J.D. Karam ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology (1994), 397–405.
49. Delbruck, M. (1940) J. Gen. Physiol., **23**, 643–660.
50. Rabinovitch, A., Hadas, H., Einav, M., Fishov, I., Melamed, Z., and Zaritsky A. (1999) J. Bacteriol., **181**, 1677–1683.
51. McPeeters, D.S., Christensen, A., Young, E.T., Stormo, G., and Gold, L. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **14(14)**, 5813–5826.
52. Salser, W., Gesteland, R.F., and Bolle, A. (1967) Nature, **215**, 588–591.
53. Young, E.T. 2nd, and van Houwe, G. (1970) J. Mol. Biol., **51(3)**, 605–619.
54. Grundling, A., Manson, M.D., and Young, R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98(16)**, 9348–9352.
55. Wang, I.-N., Smith, D.L., and Young, R. (2000) Annu. Rev. Microbiol., **54**, 799–825.
56. Barenboim, M., Chang, C.-Y., dib Hajj, F., and Young, R. (1999) Mol. Microbiol., **32(4)**, 715–727.
57. Young, R. and Blasi, U. (1995) FEMS Microbiol. Rev., **17**, 191–205.
58. Montag, D., Degen, M., and Henning, U. (1987) Nucleic Acids Res., **15**, 6736–6742.
59. Riede, I. (1987) J. Bacteriol., **169**, 2956–2961.
60. Abedon, S.T. (1989) Microbiol. Ecol., **18**, 79–88.
61. Abedon, S.T. (1990) J. Theor. Biol., **146**, 501–511.
62. Heineman, R.H., Molineux, I.J., and Bull, J.J. (2005) J. Mol. Evol., **61(2)**, 181–191.
63. Witte, A., Wanner, G., Blasi, U., Halfman, G., Szostak, M., and Lubitz, W. (1990) Eur. J. Bacteriol., **172**, 4109–4114.
64. Bernhardt, T.G., Wang, I.-N., Struck, D.K., and Young, R. (2001) Science, **292**, 2326–2329.
65. Rydman, P.S., and Bamford, D.H. (2002) J. Bacteriol., **184(1)**, 104–110.
66. Ziedaite, G., Daugelavicius, R., Bamford, J.K., and Bamford, D.H. (2005) J. Bacteriol., **187(15)**, 5397–5405.
67. Мирошников, К.А., Файзуллина, Н.М., Сыкилинда, Н.Н., Месянжников, В.В. (2006), Биохимия, **71(3)**, 378–384.
68. Henrissat, B., and Bairoch, A. (1996) Biochem. J., **316**, 695–696.
69. Blackburn, N.T., and Clarke, A.J. (2001) J. Mol. Evol., **52**, 78–84.
70. Fastrez, J. (1996) EXS, **75**, 35–64.
71. Weaver, L.H., Grutter, M.G., Remington, S.J., Gray, T.M., Isaacs, N.W., and Matthews, B.W. (1985) J. Mol. Evol., **21**, 97–111.
72. Monzingo, A.F., Marcotte, E.M., Hart, P.J., and Robertus, J.D. (1996) Nature Struct. Biol., **3**, 133–140.
73. Bachali, S., Bailly, X., Jollus, J., Jollus, P., and Deutsch, J.S. (2004) Eur. J. Biochem., **271**, 237–242.
74. Enzyme Nomenclature (1992) (Academic Press, San Diego, California) and <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
75. Jaeger, T., Arsic, M., and Mayer, C. (2005) J. Biol. Chem., **280**, 30100–30106.
76. Remington, S.J., Anderson, W.F., Owen, J., Ten Eyck, L.F., Grainger, C.T., and Matthews, B.W. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., **75(2)**, 265–270.

77. Weaver, L.H., and Matthews, B.W. (1987) *J. Mol. Biol.*, **193**(1), 189–199.
78. Blake, C.C., Fenn, R.H., North, A.C., Phillips, D.C., and Poljak, R.J. (1962) *Nature*, **196**, 1173–1176.
79. Phillips, D.C. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 484–495.
80. Koshland, D.E. (1953) *Biol. Rev.*, **28**, 416–436.
81. Fukamizo, T. (2000) *Curr. Protein Pept. Sci.*, **1**, 105–124.
82. Vocadlo, D.J., Davies, G.J., Laine, R., and Withers, S.G. (2001) *Nature*, **412**, 835–838.
83. Evrard, C., Declercq, J.-P., and Fastrez, (1997) *Acta Crystallog. sect. D*, **53**, 217–219.
84. Evrard, C., Fastrez, J., and Declercq, J.-P. (1998) *J. Mol. Biol.*, **276**, 151–164.
85. Reid, C.W., Blackburn, N.T., Legaree, B.A., Auzanneau, F.-I., and Clarke, A.J. (2001) *FEBS Lett.* **574**, 73–79.
86. Thunnissen, A.M., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Rozeboom, H.J., Engel, H., Keck, W., and Dijkstra, B.W. (1994) *Nature*, **367**, 750–753.
87. Thunnissen, A.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., and Dijkstra, B.W. (1995) *Biochemistry*, **34**, 12729–12737.
88. Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J.W., and Studier, F.W. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4034–4038.
89. Zhang, X., and Studier, F.W. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340** (4), 707–730.
90. Genereux, C., Dehareng, D., Devreeze, B., Van Beeumen, J., Frere, J.M., and Joris, B. (2004) *Biochem. J.*, **377**, 111–120.
91. Caldentey, J., and Bamford, D.H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1159**, 44–50.
92. Pei, J., and Grishin, N.V. (2005) *Protein Sci.*, **14**, 1370–1374.
93. Diaz, E., Lopez, R., and Garcia, J.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(20), 8125–8129.
94. Lopez, R., Garcia, E., Garcia, P., and Garcia, J.L. (1997) *Drug Resist.*, **3**(2), 199–211.
95. Desiere, F., Lucchini, S., and Brunschow, H. (1998) *Virology*, **241**(2), 345–356.
96. Sheehan, M.M., Stanley, E., Fitzgerald, G.F., and van Sinderen, D. (1999) *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(2), 569–577.
97. Hermoso, J.A., Monterroso, B., Albert, A., Galan, B., Ahrazem, O., Garcia, P., Martinez-Ripoll, M., Garcia, J.L., and Menendez, M. (2003) *Structure*, **11**(10), 1239–1249.
98. Morita, M., Tanji, Y., Orito, Y., Mizoguchi, K., Soejima, A., and Unno, H. (2001) *FEBS Letters*, **500**, 56–59.
99. Navarre, W.W., Ton-That, H., Faull, K.F., and Schneewind, O. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15847–15856.
100. Loeffler, J.M., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2001) *Science*, **294**, 2170–2172.
101. Foley, S., Bruttin, A., and Brunschow, H. (2000) *J. Virol.*, **74**(2), 611–618.
102. O'Flaherty, S., Ross, R.P., Meaney, W., Fitzgerald, G.F., Elbreki, M.F., and Coffey, A. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(4), 1836–1842.
103. Mosig, G., Lin, G.W., Franklin, J., and Fan, W.H. (1989) *New Biol.*, **1**, 171–179.
104. LoConte, L., Ailey, B., Hubbard, T.J., Brenner, S.E., Murzin, A.G., and Chothia, C. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**(1), 257–259.
105. Varea, J., Monterroso, B., Saiz, J.L., Lopez-Zumel, C., Garcia, J.L., Laynez, J., Garcia, P., and Menendez, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**(42), 43697–43707.
106. Lavigne, R., Briers, Y., Hertveldt, K., Robben, J., and Volckaert, G. (2004) *Cell Mol. Life Sci.*, **61**(21), 2753–2759.
107. Schuch, R., Nelson, D., and Fischetti, V.A. (2002) *Nature*, **418**, 884–889.

-
108. Nelson, D., Loomis, L., and Fischetti, V.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(7), 4107–4112.
109. Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., and Fischetti, V.A. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(1), 111–117.
110. Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**(1), 375–377.
111. Loeffler, J.M., Djurkovic, S., and Fischetti, V.A. (2003) *Infect. Immun.*, **71**(11), 6199–6204.
112. Fischetti, V.A. (2005) *Trends Microbiol.*, **13**(10), 491–496.
113. Loessner, M.J. (2005) *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**(4), 480–487.
114. Jado, I., Lopez, R., Garcia, E., Fenoll, A., Casal, J., and Garcia, P. (2003) *J. Antimicrob. Chemoter.*, **52**, 967–973.
115. Turner, M.S., Waldherr, F., Loessner, M.J., and Giffard, P.M. (2006) *Syst. Appl. Microbiol.*, **29**(2), 165–171.
116. Djurkovic, S., Loeffler, J.M., and Fischetti, V.A. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(3), 1225–1228.