



Lizostafyna – źródła otrzymywania i zastosowanie

Piotr Szweda¹, Roman Kotłowski¹, Józef Kur²

¹Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

²Katedra Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Lysostaphin – sources and applications

Summary

Lysostaphin is a zinc metalloproteinase extracted from *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* that degrades the cell wall of almost all known staphylococcal species. The target of the lysostaphin activity is the pentaglycine interpeptide bridges of the unique staphylococcal peptidoglycan, where the enzyme cleaves the Gly-Gly bond and lyses cells in all metabolic states (growing, resting, or heat killed). The specificity of the pentaglycine peptide is very high and other gram-positive and gram-negative bacteria are not susceptible to this enzyme. The unique biological activity of lysostaphin presents numerous possibilities for applications of this enzyme in the medical, veterinary, food industry and research fields. Lysostaphin is frequently used as a staphylolytic agent for the liberation of intracellular enzymes, nucleic acids, and cell membrane and surface components. Lysostaphin was tested as a chemotherapeutic agent. Lysostaphin application was also shown to be effective in reducing the nasal carriage of *S. aureus* in humans. There are also examples for application of this enzyme in food protection.

Adres do korespondencji

Piotr Szweda,
Katedra Chemii,
Technologii
i Biotechnologii Żywności,
Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska,
ul. Narutowicza 11/12,
80-952 Gdańsk

Key words:

purification, expression, peptidase, peptidoglycan, staphylococci.

1. Wstęp

Lizostafyna jest zewnątrzkomórkową glicylo-glicylową endopeptydazą wytwarzaną przez bakterie *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus*. Enzym ten ma zdolność lizowania ścian komórkowych praktycznie wszystkich gatunków bakterii z rodzaju

Staphylococcus (1,2). Ze względu na aktywność biologiczną rozważa się wykorzystanie tego białka jako alternatywny chemioterapeutyk przeciw infekcjom wywołanym przez gronkowce oraz do ochrony produktów żywnościowych przed zanieczyszczeniami gronkowcowymi. Czynnikiem uniemożliwiającym wykorzystywanie tego białka na szerszą skalę jest brak odpowiednio wydajnych źródeł i, co za tym idzie, wysoka cena tego enzymu. Rozwiązaniem problemu może być otrzymywanie lizostafyny jako białka heterologicznego w systemach ekspresyjnych bakterii *Escherichia coli* lub drożdży *Pichia pastoris*.

2. Budowa i ogólna charakterystyka lizostafyny

Początkowo nazwa „lizostafyna” odnosiła się do surowego preparatu hydrolaz peptydoglikanu, wyizolowanych ze *Staphylococcus simulans* biovar *staphylophilicus*. W przeprowadzonych dokładnych analizach wykazano, że preparat ten zawierał trzy białka: muramidazę, glukozaminidazę oraz glicylo-glicylową endopeptydazę (3,4). Obecnie nazwa lizostafyna odnosi się tylko do lizującej peptydoglikan gronkowców endopeptydazy glicylo-glicylovej. Lizostafyna lizuje peptydoglikan gronkowców poprzez hydrolizę wiązania peptydowego pomiędzy trzecią i czwartą resztą glicyny w pentaglicynowych mostkach międzypeptydowych (5). Koagulazoujemne gronkowce, których mostki międzypeptydowe zawierają także serynę są mniej podatne na działanie lizostafyny (6,7). Skład aminokwasowy mostków międzypeptydowych bakterii spoza rodzaju *Staphylococcus* jest zupełnie odmienny, co powoduje, że są one niewrażliwe na działanie tego enzymu. Duża specyficzność substratowa lizostafyny jest bardzo korzystna z punktu widzenia praktycznych możliwości zastosowania tego enzymu.

Gen kodujący lizostafynę zlokalizowany jest w największym z pięciu plazmidów (pACK1) występujących w komórkach *S. simulans* (8). Na podstawie analizy sekwencji wykazano, że lizostafyna jest białkiem monomerycznym, syntetyzowanym jako preprobiałko (5,9,10). W jego cząsteczce można wyróżnić trzy regiony (rys.): (1) sekwencję sygnałową „pre” – o długości 36 reszt aminokwasowych; (2) sekwencję „pro” – o długości 211 aminokwasów, na N-końcu propeptydu znajduje się sekwencja 12 reszt aminokwasowych, 195 następnym reszt aminokwasowych tworzy 15-trzynastoaminokwasowych modułów o powtarzającej się sekwencji, na C-końcu znajduje się sekwencja 4 reszt aminokwasowych; (3) białko dojrzałe – o długości 246 reszt aminokwasowych, odpowiedzialne za aktywność biologiczną, czyli zdolność do rozkładu ścian komórkowych gronkowców (5).

Peptyd sygnałowy „pre” oraz N-końcowa sekwencja 12 aminokwasów propeptydu odpowiedzialne są za wydzielanie enzymu poza komórkę (5).

Cechą charakterystyczną lizostafyny jest obecność w propeptydzie 15-tandemowo powtarzających się motywów sekwencyjnych. Składają się one z 13 reszt aminokwasowych: Ala-Glu-Val-Glu-Thr-Ser-Lys-Ala-Pro-Val-Glu-Asn-Thr. Piętnasty moduł różni się od pozostałych trzema aminokwasami: Ala-Glu-Val-Glu-Thr-Ser-Lys-Ala-Leu-

Met Lys Lys Thr Lys Asn Asn Tyr Tyr Thr Arg Pro
 Leu Ala Ile Gly Leu Ser Thr Phe Ala Leu Ala Ser
 Ile Val Tyr Gly Gly Ile Gln Asn Glu Thr His Ala

Peptyd sygnałowy – „pre”

Ser Glu Lys Ser Asn Met Asp Val Ser Lys Lys Val
 (1) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (2) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (3) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (4) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (5) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (6) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (7) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (8) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (9) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (10) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (11) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (12) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (13) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (14) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Pro Val Glu Asn Thr*
 (15) *Ala Glu Val Glu Thr Ser Lys Ala Leu Val Gln Asn Arg*
 Thr Ala Leu Arg

Fragment „pro”

Ala Ala Thr His Glu His Ser Ala Gln Trp Leu Asn Asn Tyr
 Lys Lys Gly Tyr GlyTyr Gly Pro Tyr Pro Leu Gly Ile Asn
 Gly Gly Met **His** Tyr Gly Val **Asp** Phe Phe Met Asn Ile Gly
 Thr Pro Val Lys Ala Ile Ser Ser Gly Lys Ile Val Glu Ala
 Gly Trp Ser Asn Tyr Gly Gly Gly Asn Gln Ile Gly Leu Ile
 Glu Asn Asp Gly Val His Arg Gln Trp *Tyr* Met *His* Leu Ser
 Lys Tyr Asn Val Lys Val Gly Asp Tyr *Ial* Lys Ala Gly Gln
 Ile Ile Gly Trp Ser Gly Ser Thr *Gly* Tyr Ser Thr Ala Pro
His Leu **His** Phe Gln Arg Met Val Asn Ser Phe Ser Asn Ser
 Thr Ala Gln Asp Pro Met Pro Phe Leu Lys Ser Ala Gly Tyr
 Gly Lys Ala Gly Gly Thr Val Thr Pro Thr Pro Asn Thr Gly
 Trp Lys Thr Asn Lys Tyr Gly Thr Leu Tyr Lys Ser Glu Ser
 Ala Ser Phe Thr Pro Asn Thr Asp Ile Ile Thr Arg Thr Thr
 Gly Pro Phe Arg Ser Met Pro Gln Ser Gly Val Leu Lys Ala
 Gly Gln Thr Ile His Tyr Asp Glu Val Met Lys Gln Asp Gly
 His Val Trp Val Gly Tyr Thr Gly Asn Ser Gly Gln Arg Ile
 Tyr Leu Pro Val Arg Thr Trp Asn Lys Ser Thr Asn Thr Leu
 Gly Val Leu Trp Gly Thr Ile Lys

Białko dojrzale

Rys. Sekwencja aminokwasowa lizostafiny. Kursywą oznaczono powtarzające się w propeptydzie 13-aminokwasowe motywy sekwencyjne. Aminokwasy, które uległy zmianie w ostatnim powtórzeniu podkreślono. Reszty aminokwasowe, które wchodzi w skład sekwencji aminokwasowej charakterystycznej dla grupy proteaz typu lizostafiny (Tyr – X – His – X₁₁ – Val – X_{12/20} – Gly – X₅₋₆ – His – X – His) (X – oznacza dowolny aminokwas) oznaczono podkreśloną kursywą. Na przyciemnionym tle przedstawiono reszty aminokwasowe, które prawdopodobnie są ligandami jonów cynku.

-Val-Gln-Asn-Arg (podkreślono różnice; rys.). Ta część propeptydu nie jest istotna dla aktywności, sekrecji enzymu oraz prawidłowego składania białka i, co ciekawe, powoduje nawet obniżenie aktywności biologicznej lizostafyny (5).

Lizostafyna syntetyzowana jest jako preprobiałko. W trakcie transportu poza komórkę następuje degradacja propeptydu, co powoduje aktywację enzymu. Dojrzała forma lizostafyny ma aktywność ponad 4-krotnie wyższą w porównaniu z proenzymem (5). Degradacja fragmentu „pro” przeprowadzana jest przez kodowaną w genomie jądrowym proteazę sulfhydrylową o masie cząsteczkowej około 18 kDa (11,12). Propeptyd jest degradowany na małe fragmenty, a cięcie następuje najprawdopodobniej po każdym 13-aminokwasowym powtórzeniu. Świadczy o tym powstawanie dużej liczby produktów pośrednich o masie cząsteczkowej pomiędzy masą proenzymu a produktem końcowym, dojrzałą formą lizostafyny (5). Trawienie propeptydu rozpoczyna się już w trakcie przechodzenia białka przez ścianę komórkową i jest kończone na zewnątrz komórki, w środowisku wzrostu bakterii.

Bakterie *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolitycus* są niewrażliwe na wytwarzaną przez nie lizostafynę, pomimo obecności w ich peptydoglikanie pentaglicynowych mostków międzypeptydowych. Jest to spowodowane wytwarzaniem białka oporności na lizostafynę (*lysostaphin immunity factor*) (13,14). Białko to wymienia trzecią i piątą resztę glicyny mostka międzypeptydowego na reszty seryny (15). Lizostafyna nie wykazuje zdolności hydrolizowania połączeń Ser – Gly ani Gly – Ser, co uniemożliwia lizę zmodyfikowanego peptydoglikanu bakterii *S. simulans* (7). Synteza lizostafyny w formie propeptydu, o obniżonej aktywności jest dodatkową formą ochrony komórek, zanim nastąpi wymiana aminokwasów w mostkach międzypeptydowych. Białko oporności na lizostafynę zbudowane jest z 413 reszt aminokwasowych i ma masę cząsteczkową 49 kDa. Gen kodujący to białko (*lif*), podobnie jak gen lizostafyny, znajduje się w plazmidzie pACK1 (5,14). Jest on odwrotnie zorientowany w stosunku do genu kodującego lizostafynę, a pomiędzy genami znajduje się odcinek niekodujący o długości 208 pz (5).

„Dojrzała” lizostafyna jest białkiem monomerycznym o masie cząsteczkowej 26,9 kDa. Jest to metaloproteaza, która w centrum aktywnym zawiera jon cynku (16). Optymalna temperatura działania enzymu wynosi około 40°C natomiast pH 7,5. Punkt izoelektryczny pI wynosi 9,5 (3,4).

Oprócz aktywności stafilolitycznej lizostafyna wykazuje także zdolność hydrolizowania białek bogatych w glicynę, na przykład elastyny, która jest jednym ze składników tkanki łącznej zwierząt i człowieka (17). Optymalne warunki działania lizostafyny na elastynę są identyczne jak w przypadku aktywności stafilolitycznej. Obie aktywności enzymu są hamowane w obecności chelatorów jonów dwuwartościowych, takich jak: EDTA i o-fenantrolina oraz jonów metali ciężkich: Cu^{2+} , Pb^{2+} . Co ciekawe, silnym inhibitorem obydwu aktywności są także jony cynku (16), który jest składnikiem centrum aktywnego tego enzymu. Inkubacja z trypsyną powoduje całkowitą utratę aktywności lizostafyny do lizowania ścian komórkowych bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, natomiast zdolność do hydrolizy elastyny zmniejsza się tylko o 18%

(17). Centrum aktywne lizostafiny najprawdopodobniej znajduje się w N-końcowej części dojrzałego białka, natomiast za wiązanie substratu, ścian komórkowych gronkowców, odpowiedzialne są 92 reszty C-końcowego regionu enzymu (18). Proteolityczne cięcie enzymu trypsyną powoduje rozdzielenie centrum aktywnego lizostafiny od części białka odpowiedzialnej za wiązanie do substratu, co powoduje utratę aktywności stafilolitycznej. W przypadku aktywności elastolitycznej centrum aktywne i centrum wiązania substratu prawdopodobnie nie ulegają rozdzielению w wyniku trawienia trypsyną i dlatego spadek aktywności jest niewielki (17).

Pomimo intensywnych badań, jak dotąd, nie udało się ustalić struktury przestrzennej lizostafiny. Nieznany jest też mechanizm działania tego enzymu. Lizostafina zaliczana jest do nowej rodziny białek, tj. proteinaz cynkowych (w literaturze spotyka się też określenie z j. ang. *lysostaphin – type peptidases*). Cechą wspólną tej grupy białek jest występowanie w cząsteczce silnie zakonserwowanej sekwencji aminokwasowej: Tyr – X – His – X₁₁ – Val – X_{12/20} – Gly – X₅₋₆ – His (X – dowolny aminokwas) (19,20). W przypadku dojrzałej formy lizostafiny są to aminokwasy zajmujące pozycje: Tyr⁸⁰, His⁸², Val⁹⁴, Gly¹⁰⁷ i His¹¹³ (rys.). Bochtler i wsp. (21) proponują rozszerzenie przedstawionej sekwencji o kolejną resztę His, w przypadku lizostafiny His¹¹⁵, której obecność jest także silnie zakonserwowana w tej grupie peptydaz. Jedynym enzymem tej grupy proteaz, dla którego poznano strukturę krystaliczną, jest białko LytM (22). Szczególnie istotne w tym przypadku było poznanie struktury miejsca wiązania jonów Zn²⁺, która jest najprawdopodobniej taka sama także dla pozostałych członków tej grupy białek. Białko LytM jest także wytwarzane jako preprobiałko. Ligandami jonu cynku w preproenzymie są: Asn¹¹⁷ (atom O grupy karbonylowej), His²¹⁰ (atom N pierścienia imidazolowego), Asp²¹⁴ (atom O grupy karboksylowej), His²⁹³ (atom N pierścienia imidazolowego). Po odcięciu fragmentu „pro”, 185 N-terminalnych reszt aminokwasowych, nastąpił zdecydowany wzrost aktywności białka, natomiast miejsce reszty Asn¹¹⁷ najprawdopodobniej zajmuje cząsteczka wody. Wbrew temu co sugerowali Li i wsp. (23), ligandem jonów cynku nie jest reszta His²⁹¹, jest ona jednak bardzo istotna dla stafilolitycznej aktywności enzymu. Wymiana reszty tego aminokwasu na resztę alaniny powodowała utratę aktywności (22).

Sekwencja aminokwasowa lizostafiny jest w 83% homologiczna z sekwencją aminokwasową białka LytM. Analizując sekwencje aminokwasowe tych białek można wyciągnąć wniosek, że w przypadku lizostafiny ligandami jonów cynku są: His³², Asp³⁶ i His¹¹⁵ (rys.). Obniżona aktywność prolizostafiny najprawdopodobniej wynika z chelatowania jonów cynku przez jeden z aminokwasów fragmentu „pro”, który po aktywacji białka zastępowany jest przez cząsteczkę wody.

3. Źródła lizostafiny

W przyrodzie lizostafina wytwarzana jest przez jeden szczep bakterii *Staphylococcus simulans* biovar *staphylophilicus* ATCC1362 (1,2). Bakterie te wciąż są jednym z podsta-

wowych źródeł tego białka. Wydajność otrzymywania enzymu ze źródła naturalnego jest jednak niewielka, a opisane metody oczyszczania skomplikowane. Metoda opracowana w 1965 r. przez Schindlera i Schuhardta (2) polega na wstępnym frakcjonowaniu białek siarczanem amonu, chromatografii jonowymienną na złożu DEAE – celuloza oraz dodatkowym frakcjonowaniu siarczanem amonu. Marova i Dadak (24) opracowali metodę oczyszczania lizostafiny, składającą się z ultrafiltracji, chromatografii jonowymienną na złożu DEAE – celuloza oraz filtracji żelowej na złożu Sephadex G-50. Metoda ta, umożliwia co prawda otrzymywanie dobrze oczyszczonego preparatu enzymu, ale z wydajnością na niskim poziomie, albowiem w trakcie całego procesu oczyszczania traci się ponad 90% lizostafiny. Najlepsza, jak dotąd, procedura oczyszczania lizostafiny z pożywki, w której hodowano *S. simulans*, została opracowana przez Fedorova i wsp. (25). W metodzie tej wykorzystano następujące po sobie etapy: ultrafiltrację, chromatografię jonowymienną i hydrofobową. Całkowita wydajność tej metody wynosi około 50%, a otrzymywany preparat jest dobrze oczyszczony.

Opisano także kilka układów ekspresyjnych umożliwiających otrzymywanie lizostafiny w komórkach bakterii *E. coli*. Pierwszy z układów został skonstruowany przez Chan'a (26), w którym gen kodujący lizostafinę wklonowano do wektora ekspresyjnego pET29b(+). Umożliwiło to otrzymanie około 11 000 jednostek enzymu z jednego litra hodowli bakterii, gdzie jako jednostkę aktywności przyjęto ilość enzymu, która powoduje spadek absorbancji w 1 ml zawiesiny komórek *S. aureus* z 1,0 do 0,5 w ciągu 10 minut, w 37°C. Zastosowano jednak bardzo drogi, nie nadający się do otrzymywania enzymu na większą skalę, sposób oczyszczania tego białka za pomocą chromatografii powinowactwa, stosując jako złożę ściany komórkowe gronkowców opornych na lizostafinę (26). Trzy kolejne układy ekspresyjne skonstruowano w Politechnice Gdańskiej, gdzie gen kodujący dojrzałą formę lizostafiny wklonowano do plazmidów pTYB12 (27), pBAD/Thio – TOPO i pET23b(+) (28) i otrzymano odpowiednio: 3000, 3000 i 13 000 jednostek enzymu z jednego litra hodowli. Jednostkę aktywności definiowano w tych przypadkach jako ilość białka, która powodowała spadek absorbancji w 6 ml zawiesiny bakterii z rodzaju *Staphylococcus aureus* z 0,25 do 0,125 w ciągu 10 minut (jednostka międzynarodowa) i stąd trudno porównywać te wyniki z uzyskanymi przez Chan'a (26). We wszystkich przypadkach lizostafinę połączono z domenami fuzyjnymi ułatwiającymi oczyszczanie białka rekombinowanego. Do regionu N-końcowego enzymu otrzymywanego w układzie pTYB12 wprowadzono domenę wiążącą chitynę (CBD) umożliwiającą oczyszczanie białka na złożu chitynowym oraz białko inteiny, które umożliwiło odcięcie domen fuzyjnych i otrzymanie lizostafiny identycznej z izolowaną ze źródła naturalnego. Do aminoterminalnego odcinka enzymu otrzymywanego w układzie pBAD wprowadzono zmodyfikowaną tioredoksynę oraz domenę oligohistydynową His₆. Do karboksyterminalnego regionu lizostafiny otrzymywanej w układzie pET także wprowadzono domenę oligohistydynową His₆. Dzięki tym domenom białka z układów pBAD i pET oczyszczano za pomocą chromatografii metalopowinowactwa. Układ

pET jest najbardziej wydajnym źródłem lizostafiny jaki opisano dotychczas w literaturze (28).

Wydajne źródła rekombinowanej lizostafiny opracowano prawdopodobnie w brytyjskiej firmie Avecia. Firma ta jest dostawcą lizostafiny dla amerykańskiego koncernu Biosynexus (Gaithersburg, Meryland). W jednostce tej prowadzone są intensywne badania, dotyczące możliwości wykorzystania lizostafiny jako leku w medycynie i weterynarii. Z nieoficjalnych informacji, jakie uzyskano od John Kokai Kun (Director of Microbiology Biosynexus Incorporated) wynika, że badany w firmie enzym otrzymywany jest w komórkach bakterii *E. coli*. Wydajny układ ekspresyjny, umożliwiający otrzymywanie enzymu w komórkach *Bacillus sphaericus* opracowano w firmie Sigma. Niestety, podobnie jak w przypadku firmy Biosynexus, niedostępne są jakiegokolwiek informacje dotyczące wykorzystywanych układów ekspresyjnych oraz sposobu oczyszczania białka.

Ekspresję lizostafiny uzyskano także w komórkach bakterii *Bacillus subtilis* (29), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* (30), *Staphylococcus carnosus* (5), *E. coli* (układy nieekspresyjne) (9), pleśni *Penicillium nalgoviense* (31), a także w komórkach ssaczyc (32). Wydajność syntezy enzymu we wszystkich przypadkach była na bardzo niskim poziomie.

4. Możliwości zastosowania lizostafiny

4.1. Badania laboratoryjne

Lizostafyna ma zdolność specyficznego lizowania ścian komórkowych bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Tę aktywność wykorzystuje się do efektywnej izolacji DNA z gronkowców w celach diagnostycznych do identyfikacji i różnicowania bakterii tego rodzaju (33-35). Wrażliwość na lizostafinę jest przede wszystkim kryterium umożliwiającym szybkie i łatwe odróżnianie gronkowców od bakterii z rodzaju *Micrococcus*. Ze względu na bliskie pokrewieństwo tych bakterii, należących do rodziny *Micrococcaceae*, identyfikacja za pomocą klasycznych testów biochemicznych często stwarza dużo problemów. W przeciwieństwie do gronkowców, bakterie z rodzaju *Micrococcus* są całkowicie niewrażliwe na działanie lizostafiny (6,36-39).

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* są stosunkowo odporne na działanie tradycyjnie stosowanych czynników lizujących ścianę komórkową, takich jak: detergenty, lizozym, szok osmotyczny czy ucieranie z wodorotlenkiem glinu (alumina). Podczas izolacji materiału genetycznego, białek, enzymów, struktur komórkowych oraz otrzymywania protoplastów bakterii tego rodzaju, liza peptydoglikanu najczęściej prowadzona jest za pomocą lizostafiny. Enzym ten jest podstawowym elementem większości komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji DNA z gronkowców. Zastosowanie lizostafiny umożliwia otrzymywanie nienaruszonego DNA chromosomalne-

go, które może być wykorzystywane do reakcji PCR fingerprinting, a nawet do różnicowania szczepów za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) (40). Z kolei izolacja nienaruszonego plazmidowego DNA umożliwia prawidłowe wykonanie profili plazmidowych analizowanych szczepów (41-43). Za pomocą badań z użyciem mikroskopu elektronowego wykazano, że 20-minutowa inkubacja komórek bakterii *S. aureus* z lizostafyną (1 u/ml) w 24% roztworze NaCl umożliwia otrzymanie protoplastów tych bakterii (44). Inkubacja z lizostafyną jest też najprostszą metodą izolacji białek z komórek gronkowców. Metoda ta jest często wykorzystywana w trakcie przygotowywania próbek do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS – SDS PAGE (45,46), a nawet do wykrywania bakterii z rodzaju *Staphylococcus* za pomocą metod immunochemicznych – testu ELISA (47).

4.2. Przemysł spożywczy i weterynaria

Ze względu na zdolność do niszczenia gronkowców lizostafyna mogłaby znaleźć zastosowanie do ochrony produktów żywnościowych. Innymi enzymami stosowanymi do poprawy mikrobiologicznej jakości żywności są na przykład lizozym czy niżyna.

Bakterie *S. aureus* są bardzo częstą przyczyną zatruc pokarmowych. Według danych PZH w 2003 r. bakterie te wywołały 2% wszystkich odnotowanych w Polsce przypadków zatruc pokarmowych, co stawia je na drugim miejscu po bakteriach z rodzaju *Salmonella* (81,5%). Gronkowce wytwarzają peptydowe termostabilne enterotoksyny, które wywołują intoksykację. Najczęstszym źródłem zatruc bakteriami tego rodzaju są: ciasta, kremy i lody wyprodukowane z udziałem jaj lub bitej śmietany, gotowane mięso, drób, ryby oraz produkty mleczarskie.

Ze względu na wielkotonażowy charakter produkcji wykorzystanie lizostafiny w przemyśle żywnościowym wymagałoby opracowania bardzo wydajnych źródeł tego białka oraz szybkich i niedrogich metod oczyszczania enzymu. W przypadku produktów fermentowanych można by także wykorzystać lizostafinę produkowaną jako białko heterologiczne w komórkach bakterii kultur starterowych. Próby takie, z powodzeniem, podjęli Cavadini i wsp. (30). Gen kodujący lizostafinę z odcinkami „pre” i „pro” wklonowano do komórek bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Otrzymano rekombinowane szczepy bakterii *Lactobacillus curvatus* LTH 1432 oraz *Lactobacillus sake* LTH 673, które wykorzystywane są do otrzymywania mięsnych produktów fermentowanych. W komórkach obydwu gatunków bakterii uzyskano ekspresję biologicznie aktywnej lizostafiny, która była wydzielana do środowiska wzrostu. Wydzielanie enzymu do podłoża jest w tym przypadku szczególnie korzystne ze względu na możliwość niszczenia gronkowców obecnych w produkcie. Nie zauważono też żadnego niekorzystnego wpływu wytwarzania lizostafiny na wzrost komórek *L. curvatus* oraz *L. sake* (30). Bakterie *L. curvatus* zdolne do wytwarzania lizostafiny (Lys+) wykorzystano następnie do ochrony przed gronkowcami mięsnych produk-

tów fermentowanych. Ze względu na bezpieczeństwo eksperymentatorów w początkowych układach modelowych w miejsce *S. aureus* użyto bakterie *S. carnosus*. Z powodu niskiego pH w trakcie dojrzewania produktów enzym tracił ponad 90% swojej aktywności, wystarczało to jednak do zniszczenia w ciągu dwóch, trzech dni sztucznie wprowadzanych do produktu bakterii *S. carnosus* w ilości początkowej 10^5 CFU/g. Dla porównania, w produktach zawierających bakterie *L. curvatus* nie mających zdolności do wytwarzania lizostafiny liczba gronkowców wzrastała w tym czasie do 10^6 CFU/g w części zewnętrznej i nie ulegała zmianie w części centralnej produktu (48). Otrzymany szczep *L. curvatus* (Lys+) bardzo skutecznie niszczył też bakterie *S. carnosus* w sałatkach mięsno-majonezowych. Liczba gronkowców w sałatce inkubowanej w 25°C w ciągu 24 godzin spadała od 10^4 CFU/g do poziomu poniżej granicy wykrywalności (10^2 CFU/g). W sałatce kontrolnej, do której wprowadzono szczep *L. curvatus* nie mającego zdolności do wytwarzania lizostafiny, liczba gronkowców wzrastała w tym czasie do 10^7 CFU/g. W próbach przeprowadzonych już z *S. aureus* także zaobserwowano bardzo szybki spadek liczby drobnoustrojów. W kielbasach, do których wprowadzono 10^5 komórek *S. aureus* na gram produktu, w ciągu 2-3 dni liczba bakterii spadała praktycznie do zera, natomiast w próbach kontrolnych pozostawała na stałym poziomie.

Ekspresję lizostafiny uzyskano również w komórkach pleśni *Penicillium nalgoviense*, które wykorzystywane są do otrzymywania mięsnych produktów fermentowanych. Zastosowanie pleśni pozwoliło na skuteczne niszczenie gronkowców tylko w powierzchniowej części kielbasy, wewnątrz produktu enzym był nieskuteczny (31).

Wspomniano już, że zatrucie enterotoksynami gronkowcowymi często jest efektem spożycia mleka i jego przetworów zanieczyszczonych tego rodzaju bakteriami. Przyczyną obecności gronkowców w mleku są: niezachowanie podstawowych zasad higieny w trakcie pozyskiwania mleka, jego transportu i przetwarzania, a przede wszystkim przewlekłe zapalenia wymion krów, tak zwane mastitis. Bakterie *S. aureus* są jednym z głównych patogenów wywołujących mastitis, powodują one od 15 do 30% tych schorzeń. Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych roczne straty w przemyśle mleczarskim wynikające z zachorowań krów na mastitis wynoszą 1,7 miliarda dolarów. Obecnie leczenie mastitis wymaga stosowania antybiotyków, co uniemożliwia dalsze wykorzystanie mleka, aż do momentu zakończenia antybiotykoterapii. Ponadto często jest ona mało skuteczna, długotrwała i, co za tym idzie, bardzo kosztowna; obserwowane są także nawroty choroby. Prowadzone są intensywne badania, których celem jest sprawdzenie możliwości wykorzystania lizostafiny do leczenia mastitis. Otrzymano genetycznie zmodyfikowane myszy zdolne do wytwarzania lizostafiny w komórkach gruczołu mlekowego. W sekwencji aminokwasowej lizostafiny znajdują się dwie trójpeptydowe sekwencje, które w trakcie modyfikacji potranslacyjnej w komórkach organizmów eukariotycznych ulegają glikozylacji: Asn¹²⁵ Ser¹²⁶ Thr¹²⁷ oraz Asn²³² Ser²³³ Thr²³⁴ (w obydwu przypadkach reszta cukrowa dołączana jest do reszty Asn). Próby otrzymywania biologicznie aktywnej lizostafiny w komórkach gruczołu mlekowego myszy kończyły się niepowodzeniem, do-

póki obydwie reszty Asn nie zostały zastąpione resztami Gln. Wyniki wstępnych eksperymentów były bardzo obiecujące. Ekspresja lizostafyny skutecznie hamowała rozwój bakterii w gruczole, część enzymu przechodziła do mleka, co zabezpieczało go przed rozwojem bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, nie zaobserwowano przy tym jakichkolwiek negatywnych skutków obecności w mleku nowego białka (49). Najnowsze doniesienia są już jednak mniej optymistyczne. Okazuje się, że noworodki myszy karmione mlekiem matek, u których zachodzi ekspresja lizostafyny rosną w pierwszym tygodniu życia wolniej w porównaniu z osobnikami karmionymi mlekiem matek, które nie wytwarzają enzymu (50). Ekspresja lizostafyny w komórkach gruczołu mlekowego kóz wywołuje silną odpowiedź immunologiczną. Powstające przeciwciała zwrócone są przeciwko samej lizostafynie, jak i adenowirusowi, który został użyty do wprowadzenia genu kodującego białko do komórki zwierzęcej. W ciągu 2-3 tygodni od momentu wprowadzenia genu następuje zahamowanie wytwarzania aktywnego biologicznie enzymu (51). Zjawisko to w zasadzie całkowicie dyskwalifikuje ten sposób zwalczania mastitis. Z powodzeniem natomiast stosowano preparaty lizostafyny wprowadzane do gruczołu przez kanały strzykowe. Bramley i Foster (52) stwierdzili, że podanie 10 µg lizostafyny do gruczołu mlekowego myszy, do którego wprowadzono 10⁸ CFU gronkowców, powoduje stukrotny spadek liczby bakterii w ciągu zaledwie 30 minut. Oldham i Daley (53) przeprowadzili badania na grupie 30 krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Do gruczołów mlekowych krów wprowadzano bakterie *S. aureus* ATCC 29740, po czym po trzech kolejnych udojach wieczornych wprowadzono do gruczołu roztwór lizostafyny (łącznie 100 mg enzymu). Krowę uważano za wyleczoną, jeśli w 28 kolejnych udojach nie stwierdzono obecności gronkowców. W wyniku terapii 20% strzyków zainfekowanych krów zostało oczyszczonych z bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Dla porównania terapia cefarynianem sodu pozwoliła na oczyszczenie 29% strzyków, natomiast za pomocą komercyjnie dostępnej mieszaniny antybiotyków stosowanej standardowo do leczenia mastitis bakterie usunięto z 57% strzyków. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że lizostafyna może być wykorzystywana do leczenia zapalenia gruczołu mlekowego. Zwiększenie dawki enzymu lub częstotliwości jego podawania prawdopodobnie pozwoli poprawić skuteczność terapii. Ci sami autorzy stwierdzili, że podawanie lizostafyny do gruczołu mlekowego krów przez dłuższy czas u większości zwierząt nie wywołuje wyraźnej odpowiedzi immunologicznej nawet po podaniu 18-21 dawek enzymu (2-3 g białka). Nawet u nielicznych osobników, u których wystąpiła wyraźna reakcja immunologiczna nie zaobserwowano żadnych niekorzystnych symptomów. W warunkach *in vitro* powstające przeciwciała w bardzo niewielkim stopniu hamowały aktywność enzymu (54). Wprowadzanie lizostafyny do strzyków jest zatem zdecydowanie lepszym sposobem leczenia mastitis, aniżeli ekspresja tego białka w komórkach gruczołu mlekowego. Należy zauważyć, że metoda ta została opisana ponad 10 lat temu i, jak dotychczas, nie została wprowadzona do praktyki weterynaryjnej, co wynika przede wszystkim z braku odpowiednio wydajnych źródeł enzymu i w efekcie wysokich kosztów potencjalnej tera-

pii. Na metody leczenia mastitis lizostafyną są 2 patenty (US Patent 5760026 Method for treating mastitis and other staphylococcal infections; US Patent 5858962 Composition for treating mastitis and other staphylococcal infections).

4.3. Potencjalny czynnik terapeutyczny

Od momentu wykrycia lizostafiny prowadzono intensywne badania, których celem było sprawdzenie możliwości wykorzystania tego enzymu w chemioterapii infekcji wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych ubiegłego wieku przeprowadzono liczne próby stosowania tego białka do leczenia eksperymentalnych zakażeń w zwierzęcych układach modelowych (55,56). W trakcie tych badań stwierdzono, że lizostafina mogłaby być bardzo skutecznym lekiem przeciwgronkowcowym. Wykazano także skuteczność enzymu w usuwaniu gronkowców z jamy nosowo-gardłowej ludzi (57-59). Opisano przypadek zastosowania lizostafiny do leczenia ropienia, wywołanego przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* w gardle człowieka. W wielu pracach wykazano także zdolność lizostafiny do lizowania klinicznych izolatów bakterii *S. aureus* w warunkach *in vitro*. Metoda zastosowania lizostafiny do leczenia infekcji gronkowcowych została opatentowana (US Patent 6028051 Method for the treatment of staphylococcal disease). Pomimo uzyskiwania bardzo obiecujących rezultatów, brak dostępu do odpowiednio wydajnych źródeł enzymu, problemy z jego oczyszczaniem oraz dostęp do szerszej gamy coraz doskonalszych antybiotyków zahamował badania dotyczące możliwości wykorzystania lizostafiny w medycynie na wiele lat. W ostatnim czasie ponownie obserwuje się bardzo duże zainteresowanie lizostafyną jako potencjalnym czynnikiem terapeutycznym. Jest to przede wszystkim spowodowane wzrostem oporności gronkowców na antybiotyki. W wielu ośrodkach prowadzone są intensywne badania dotyczące możliwości wykorzystywania lizostafiny do walki z gronkowcami wielolekoopornymi.

Climo i wsp. (60) wykazali, że lizostafina jest bardzo skuteczna w leczeniu zapalenia wsierdzia wywołanego przez gronkowce odporne na metycylinę (*S. aureus* MRSA), a nawet szczepy o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (*S. aureus* VISA). Króliki nowozelandzkie szczepiono 1 ml zawiesiny zawierającej 10^7 CFU szczepu *S. aureus* 27619 (metycylino-oporny) lub odpowiednio *S. aureus* HIP5827 (mający obniżoną wrażliwość na wankomycynę). Liczbę gronkowców w zastawkach zwierząt badano po czterech dniach od zaszczepienia. W grupie kontrolnej królików, która w ogóle nie była leczona, liczba bakterii *S. aureus* 27619 w zastawce wynosiła $10,79 \log_{10}$ CFU/g tkanki. W grupie osobników, której podawano lizostafynę 3 razy dziennie przez trzy dni w ilości 5 mg/kg masy ciała, liczba gronkowców spadała średnio do poziomu $2,26 \log_{10}$ CFU/g tkanki, przy czym 10 spośród 11 badanych osobników miało zupełnie sterylne zastawki. Dość skuteczna była też terapia, w której królikom przez trzy dni podawano raz dziennie lizostafynę w ilości 5 mg/kg

masy ciała i dwukrotnie wankomycynę w ilości 30 mg/kg masy ciała. W tym przypadku liczba bakterii w zastawce wynosiła średnio $3,23 \log_{10}$ CFU/g tkanki, przy czym 7 z 10 badanych osobników miało sterylną zastawkę. Trzydniowa terapia za pomocą samej lizostafyny podawanej raz dziennie w ilości 5 mg/kg masy ciała, jak i samej wankomycyny podawanej dwa razy dziennie w dawce 30 mg/kg masy ciała dała zdecydowanie gorsze rezultaty. Liczba bakterii w zastawce wynosiła odpowiednio $7,08 \log_{10}$ CFU/g tkanki, przy czym tylko 3 z 10 badanych osobników miały sterylną zastawkę (terapia lizostafyną) i $5,89 \log_{10}$ CFU/g tkanki, sterylną zastawkę stwierdzono u 10 z 15 badanych osobników (terapia wankomycyną).

Bardzo podobne wyniki uzyskano po zaszczepieniu królików szczepem o obniżonej wrażliwości na wankomycynę. W zależności od rodzaju prowadzonej terapii zwierzęta podzielono na cztery grupy. Liczbę bakterii w zastawce także określano cztery dni po zaszczepieniu królików. W grupie kontrolnej liczba bakterii wzrosła do $10,3 \log_{10}$ CFU/g tkanki. Zgodnie z przewidywaniami zupełnie nieskuteczna okazała się terapia wankomycyną. Osobniki, którym podawano ten antybiotyk przez trzy dni w ilości 30 mg/kg masy ciała zawierały średnio $9,66 \log_{10}$ CFU/g tkanki, żaden z 9 badanych osobników nie miał jałowej zastawki. Jednokrotne podanie lizostafyny w ilości 100 mg/kg masy ciała spowodowała spadek ilości bakterii do poziomu $3,03 \log_{10}$ CFU/g tkanki, zastawki trzech spośród siedmiu badanych osobników były sterylne. Najbardziej skuteczną okazała się terapia, w trakcie której królikom przez trzy dni podawano lizostafynę w dwóch dawkach po 30 mg/kg masy ciała. W tym przypadku średnia liczba bakterii w tkance spadła do poziomu $2,03 \log_{10}$ CFU/g, a zastawki pięciu spośród sześciu badanych osobników były sterylne (61).

Badano też wpływ długotrwałego podawania lizostafyny na organizm królików nowozelandzkich. Codziennie przez 9 tygodni dwóm samicom podawano enzym w ilości 15 mg/kg masy ciała. W surowicy krwi stwierdzono obecność przeciwciał w niewielkim stopniu neutralizujących aktywność lizostafyny, nie zaobserwowano żadnych symptomów niebezpiecznych dla organizmów badanych osobników (60).

W wyniku traktowania oksycylino-opornych szczepów *S. aureus* niewielkimi dawkami lizostafyny (1/2-1/4 wartości MIC), zarówno w warunkach *in vitro*, jak i w króliczym układzie modelowym zapalenia wsierdza, izolowano mutanty odporne na działanie tego białka. MIC lizostafyny dla uzyskanych mutantów wynosił od 2 do 512 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy wzrost szczepów wyjściowych był hamowany już przy stężeniu 0,015-0,06 $\mu\text{g/ml}$. W przeprowadzonej analizie składu chemicznego peptydoglikanu wykazano, że mostki międzypeptydowe wyizolowanych mutantów składały się tylko z jednej reszty glicyny, co było efektem mutacji w obrębie genu *femA*. Obecność mutacji w tym genie potwierdzono za pomocą techniki PCR. W wyniku działania niskich dawek lizostafyny doszło do wyselekcjonowania mutantów *femA*, opornych na działanie tego białka. Zmiana w budowie mostka międzypeptydowego powoduje wzrost oporności na działanie lizostafyny, a jednocześnie zdecydowanie spada oporność na oksycylinę. Wartość MIC tego antybiotyku dla mutantów mających jedną resztę glicyny w mostku międzypeptydowym wynosi od 0,25 do

1,0 $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy wartość MIC dla szczepów wyjściowych mieściła się w zakresie 16-1024 $\mu\text{g/ml}$. Wprowadzenie do komórek wyselekcjonowanych mutantów plazmidu pBBB31, zawierającego gen *femA*, spowodowało przywrócenie wrażliwości na lizostafynę i oporności na oksycylinę. Traktowanie bakterii mieszaniną tych dwóch substancji (lizostafyny i antybiotyku) skutecznie zapobiegało rozwojowi mutantów i było bardzo skuteczne w terapii. W układzie modelowym zapalenia wśierdzia u osobników, którym przez trzy dni dwa razy dziennie podawano lizostafynę w ilości zaledwie 1 mg/kg masy ciała oraz nafcylinę w ilości 200 mg/kg masy ciała, liczba bakterii w zastawce spadła o ponad 8 rzędów wielkości w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymczasem podawanie tylko lizostafyny i tylko nafcyliny w tych samych ilościach spowodowało spadek liczby bakterii odpowiednio o 1,6 i 1,3 rzędu wielkości (62). Kombinacja lizostafyny i nafcyliny okazała się także bardzo skuteczna w terapii zakażeń wywołanych przez oksycylino-oporne szczepy *S. epidermidis*. W analogicznym układzie modelowym zapalenia wśierdzia terapia mieszaniną lizostafyny i nafcyliny (w ilościach jak w omówionym układzie) powodowała spadek liczby bakterii o 5,3 rzędów wielkości w porównaniu z grupą kontrolną (z 9,4 \log_{10} CFU/g do 4,1 \log_{10} CFU/g), przy czym tylko u jednego na 8 badanych osobników stwierdzono sterylną zastawkę. Skuteczność terapii samą lizostafyną była zdecydowanie mniejsza, liczba bakterii spadała tylko o 1,25 rzędu wielkości, natomiast sama nafcylina powodowała spadek liczby bakterii tylko o 0,8 rzędu wielkości (63).

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* są bardzo częstą przyczyną bakteryjnego zapalenia rogówki oraz wnętrza oka. Zapalenie rogówki często występuje u osób używających szkieł kontaktowych, może być też skutkiem urazu mechanicznego oka, na przykład wbicia opiłka. Szczególnie niebezpieczne w skutkach jest zapalenie wnętrza oka, które może doprowadzić nawet do utraty wzroku. Szacuje się, że około 70% tych schorzeń jest następstwem wprowadzenia do oka bakterii w czasie operacji chirurgicznej. Bakterie *S. aureus* i *S. epidermidis* powodują co najmniej 50% wszystkich przypadków. Najbardziej istotnymi problemami w leczeniu tych schorzeń są rosnąca oporność bakterii na antybiotyki, a także słaba penetracja leków do tkanki. Próby wykorzystania lizostafyny do leczenia schorzeń oczu, wywołanych przez gronkowce, prowadzono w ostatnich latach w zespole O'Callaghana z Luisiana State University (64-66). W króliczym układzie modelowym wykazano bardzo dużą efektywność enzymu w terapii zapaleń rogówki, jak i wnętrza oka wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Rogówki oczu zwierząt zaszczepiano 50 CFU metycyliny-opornego szczepu *S. aureus* MRSA. Leczenie prowadzono 0,28% roztworem lizostafyny oraz w celach porównawczych 5% roztworem wankomycyny. Do oczu królików zakraplano 45 μl roztworów leków co 30 minut, przez 5 godzin, od 4 do 9 lub od 10 do 15 godziny po zainfekowaniu bakteriami. Szybsza terapia lizostafyną (od 4 do 9 godziny po zainfekowaniu) spowodowała całkowite usunięcie bakterii ze wszystkich rogówek. Dla porównania w grupie kontrolnej, której nie podawano żadnych leków liczba bakterii wzrosła do 6,52 \log_{10} CFU/rogówkę, natomiast w grupie leczonej wankomycyną do 2,3 \log_{10} CFU/rogówkę. Jeszcze większe

różnice w skuteczności działania badanych substancji zaobserwowano w przypadku terapii prowadzonej od 10 do 15 godziny po zainfekowaniu. W rogówkach traktowanych lizostafyną liczba bakterii wyniosła 0,58 log₁₀ CFU/rogówkę, podczas gdy w grupie leczonej wankomocyną liczba bakterii wzrosła aż do 5,83 log₁₀ CFU/rogówkę (64). W porównaniu z antybiotykami lizostafyna jest substancją o bardzo dużej masie cząsteczkowej. Zaskakująca jest zatem stosunkowo duża zdolność penetracji tego białka do tkanki. Wynika to prawdopodobnie ze zdolności do hydrolizy elastyny (17). W praktyce klinicznej do leczenia zapalenia rogówki stosuje się antybiotyków cefazolin w kombinacji z aminoglikozydami lub fluorochinolonami. Mieszanka antybiotyków, w postaci kropli podawana jest co 30 minut przez 48 godzin, a zatem znacznie dłużej aniżeli lizostafyna w przedstawionym układzie modelowym. Bardzo obiecujące rezultaty otrzymano także w przypadku terapii eksperymentalnego zapalenia wnętrza oka królików powodowanego przez ten sam szczep *S. aureus*. W tym przypadku do wnętrza oka królików wprowadzano 50 CFU gronkowców. Jednorazowe podanie 0,1 ml roztworu lizostafiny o stężeniu 0,01 mg/ml po 8 godzinach od momentu zainfekowania spowodowało spadek liczby bakterii średnio o 6 rzędów wielkości w porównaniu do osobników grupy kontrolnej, przy czym 75% oczu zostało całkowicie wysterylizowanych. Liczbę bakterii oznaczano po 24 godzinach od momentu zainfekowania zwierząt. Podanie lizostafiny 8 godzin po zainfekowaniu zdecydowanie ograniczyło też zmiany patologiczne tkanek oka (65). Długotrwałe podawanie królikom lizostafiny wywołało odpowiedź immunologiczną, przy czym nie zaobserwowano żadnych niebezpiecznych dla organizmu zwierząt symptomów. Obecność w surowicy przeciwciał skierowanych przeciwko lizostafynie nie spowodowało spadku efektywności terapii prowadzonej z wykorzystaniem tego białka. W analogicznym układzie modelowym zapalenia rogówki oka u osobników wytwarzających przeciwciała, liczba bakterii także spadała o około 6 rzędów wielkości, natomiast podanie pojedynczej dawki lizostafiny o stężeniu 0,1% w układzie eksperymentalnym zapalenia oka wewnętrznego spowodowało wyjałowienie wszystkich badanych oczu (66). Terapia gronkowcowego zapalenia rogówki oraz wnętrza oka za pomocą lizostafiny została opatentowana (US Patent 6315996 Topical lysostaphin therapy for staphylococcus okular infections).

Intensywne badania dotyczące możliwości wykorzystania lizostafiny w terapii infekcji wywołanych przez gronkowce prowadzone są w ostatnich latach w amerykańskiej firmie Biosynexus. Wynikiem tych badań jest opracowanie kremów do zwalczania gronkowców zasiedlających jamę nosowo-gardłową, wykazanie skuteczności lizostafiny w niszczeniu biofilmów wytwarzanych przez bakterie *S. aureus* i *S. epidermidis* oraz do zapobiegania rozwojowi tych bakterii na powierzchni cewników. Zaproponowano także metodę ograniczania odpowiedzi immunologicznej po podaniu lizostafiny.

Kolonizacja jamy nosowo-gardłowej przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* powoduje zdecydowany wzrost zagrożenia rozwoju infekcji wywołanych przez te bakterie. Von Eiff i wsp. (67) wykazali, że ponad 80% izolatów *S. aureus* wywołujących in-

fekcję było identycznych ze szczepami zasiedlającymi jamę nosowo-gardłową. Szacuje się, że 20% populacji ludzkiej to chroniczni nosiciele gronkowców w jamie nosowo-gardłowej, a u 60% ludzi występują one czasowo (68). Usunięcie gronkowców z jamy nosowo-gardłowej zdecydowanie obniżyłoby prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji wywoływanych przez te bakterie. W firmie Biosynexus opracowano kremy wazelinowe z dodatkiem lizostafiny, które bardzo skutecznie niszczyły gronkowce zasiedlające błony śluzowe nosa. Trzykrotne podanie kremu zawierającego 0,5% lizostafiny (450 µg) spowodowało całkowite usunięcie gronkowców u 100% testowanych zwierząt zainfekowanych 10^9 CFU bakterii *S. aureus* MBT5040. Już jedno-razowe podanie kremu (150 µg białka) było bardzo skuteczne i powodowało całkowite usunięcie gronkowców u 93% testowanych zwierząt. Krem zawierający lizostafinę był zdecydowanie bardziej skuteczny niż stosowane w praktyce klinicznej kremy zawierające 2% mupirocyny. Jednorazowe podanie kremu zawierającego ten antybiotyk spowodowało usunięcie gronkowców u 2 z 5 badanych zwierząt, poza tym coraz częściej notuje się izolacje szczepów opornych na mupirocynę (69).

Lizostafina bardzo skutecznie likwiduje także biofilmy tworzone przez bakterie *S. aureus* i *S. epidermidis*. Bakterie tworzące biofilm są około 1000 razy bardziej odporne na stosowane antybiotyki niż żyjące w środowisku płynnym. Tymczasem roztwory lizostafiny już w stężeniu 1 µg/ml nie tylko zabijały bakterie *S. aureus* tworzące biofilm, ale niszczyły także macierz zewnątrzkomórkowej otoczki chroniącej bakterie przed działaniem antybiotyków. Roztwory lizostafiny o stężeniu 200 µg/ml w ciągu trzech godzin całkowicie degradowały biofilm wytwarzany przez bakterie *S. epidermidis*. W przeprowadzonych próbach kontrolnych stwierdzono, że roztwory antybiotyków: oksycyliny (400 µg/ml), wankomycyny (800 µg/ml), klindamycyny (800 µg/ml) nie wywoływały praktycznie żadnego niekorzystnego oddziaływania na bakterie tworzące biofilm (70). Stwarza to możliwości wykorzystywania lizostafiny do niszczenia biofilmów wytwarzanych przez gronkowce na powierzchni implantów, czy uszkodzonych tkanek.

Połączenie lizostafiny z cząsteczkami „rozgałęzionego” glikolu polietylenowego (PEG) o masie cząsteczkowej 10 lub 40 kDa powoduje, co prawda niewielki spadek aktywności enzymu *in vitro*, ale bardzo korzystnie wpływa na jego trwałość w warunkach *in vivo*. Po podaniu dożylnym czas półtrwania enzymu połączonego z PEG wzrasta z jednej (wolna lizostafina) do 24 godzin. Przeciwciała skierowane przeciwko lizostafinie mają 10-krotnie niższe powinowactwo do enzymu połączonego z PEG, co także korzystnie wpływa na jego aktywność w warunkach *in vivo* (71).

Oszacowano, że w Stanach Zjednoczonych co roku chorym zakłada się około 200 milionów cewników. Niestety dość często zdarza się, że są one źródłem infekcji, głównie wywoływanych przez gronkowce. W badaniach przeprowadzonych w firmie Biosynexus wykazano, że lizostafina mogłaby być doskonałym i niedrogim czynnikiem zabezpieczającym cewniki przed rozwojem na ich powierzchni bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Lizostafina ulega adsorpcji na powierzchni tworzyw sztucznych. Zaledwie 15-minutowa inkubacja cewnika w roztworze o stężeniu

0,1 mg/ml pozwala związać dostateczną ilość tego białka, aby uniemożliwić rozwój bakteriom z rodzaju *Staphylococcus*. Cewniki inkubowane w roztworze lizostafyny zachowują właściwości bakteriobójcze, przez co najmniej 4 dni. Osadzona na powierzchni cewnika lizostafyna, nie tylko skutecznie uniemożliwia rozwój bakterii *S. aureus* i *S. epidermidis*, ale także powoduje ich zabijanie w roztworze, który przepływał przez cewnik (72).

We wszystkich wymienionych układach eksperymentalnych wykazano bardzo dużą efektywność lizostafyny w hamowaniu infekcji wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Potencjalna terapia zakażeń gronkowcowych wymagałoby jednak stosowania enzymu w bardzo dużych ilościach, na przykład w leczeniu zapalenia wsierdza 30 mg/kg masy ciała. Biorąc pod uwagę aktualne ceny lizostafyny, wprowadzenie tego białka do praktyki klinicznej ciągle, jak się wydaje, jest mało prawdopodobne.

5. Uwagi końcowe

Opracowanie wydajnej biotechnologicznej produkcji lizostafyny – enzymu mającego zdolność lizowania ścian komórkowych bakterii z rodzaju *Staphylococcus* powinno przyczynić się do wdrożenia wielu nowych technologii z użyciem tego enzymu. Rozważa się poważnie możliwości wykorzystania tego białka jako alternatywny chemioterapeutyk przeciw infekcjom wywoływanych przez gronkowce oraz jako czynnik ochrony produktów żywnościowych przed zanieczyszczeniami gronkowcowymi. Brak odpowiednio wydajnych źródeł tego enzymu, a co za tym idzie, wysoka cena uniemożliwiają obecnie jego stosowanie na szerszą skalę. W Politechnice Gdańskiej trwają od kilku lat bardzo zaawansowane badania nad opracowaniem wydajnych technologii produkcji lizostafyny w postaci białka heterologicznego w komórkach bakterii *E. coli* oraz drożdży *Pichia pastoris*. Opracowane dotychczas technologie produkcji i oczyszczania lizostafyny pozwalają obecnie na podjęcie na szeroką skalę badań wdrożeniowych.

Praca finansowana ze środków KBN jako projekt badawczy nr 2 P06T 10026.

Literatura

1. Schindler C. A., Schuhardt V. T., (1964), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 414-421.
2. Schindler C. A., Schuhardt V. T., (1965), Biochem. Acta., 97, 242-250.
3. Browder H. P., Zygmunt J. R., Young J. R., Tavormina P. A., (1965), Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 383-389.
4. Iversen O., Grov A., (1973), Eur. J. Biochem., 38, 293-300.
5. Thumm G., Gotz F., (1997), Mol. Microbiol., 23, 1251-1265.
6. Kloos W. E., Schleifer K. H., (1975), Int. J. Sys. Bacteriol., 25, 62-79.
7. Robinson J. M., Hardman J. K., Sloan G. L., (1979), J. Bacteriol., 137, 1158-1164.

8. Heath L. S., Heath H. E., Sloan G. L., (1987), *FEMS Microbiol. Lett.*, 44, 129-133.
9. Recsei P. A., Gruss A. D., Novick R. P., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1127-1131.
10. Heinrich P., Rosenstein R., Bohmer M., Sonner P., Gotz F., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 209, 563-569.
11. Zhou R.-Q., Chen S.-G., Recsei A. P., (1989), *Acta. Biochim. Biophys. Sinica*, 21, 65-71.
12. Neumann V. C., Heath H. E., LeBlanc P. A., Sloan G. L., (1993), *FEMS Microbiol. Lett.*, 84, 23-26.
13. Heath H. E., Heath L. S., Nitterauer J. D., Rose K. E., Sloan G. L., (1989), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 160, 1106-1109.
14. de Hart H. P., Heath H. E., Heath L. S., LeBlanc P., Sloan G. L., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1475-1479.
15. Ehlert K., Tschierske M., Mori C., Schroder W., Berger-Bachi B., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 2635-2638.
16. Trayer H. R., Buckley C. E., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 4842-4846.
17. Park P. W., Senior R. M., Griffin G. L., Broekelmann T. J., Mudd M. S., Mecham R. P., (1995), *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 139-146.
18. Baba T., Schneewind O., (1996), *EMBO J.*, 15, 4789-4797.
19. Sugai M., Fukiwara T., Akiyama T., Ohara M., Komatsuzawa H., Inoue S., Suginata H., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 1193-1202.
20. Ramadurai L., Lockwood K. J., Nadakavukaren M. J., Jayaswal R. K., (1999), *Microbiology*, 145, 801-808.
21. Bochtler M., Odintsov S. G., Marcyjaniak M., Sabala I., (2004), *Protein Sci.*, 13, 854-861.
22. Odintsov S. G., Sabala I., Marcyjaniak M., Bochtler M., (2004), *J. Mol. Biol.*, 335, 775-785.
23. Li S. L., Norioka S., Sakiyama F., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 6506-6511.
24. Marova I., Dadak V., (1993), *Folia Microbiol.*, 38, 245-252.
25. Fedorov T. V., Sorovtsev V. I., Borozdina M. A., Gusev V. V., (2003), *Biochemistry (Mosc)*, 68, 50-53.
26. Chan E., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18, 833-838.
27. Szweda P., Pladzyk R., Kotłowski R., Kur J., (2001), *Protein Expr. Purif.*, 22, 467-471.
28. Szweda P., Kotłowski R., Kur J., (2005), *J. Biotechnol.*, 117, 203-213.
29. Gaier W., Vogel R. F., Hammes W. P., (1992), *Let. Appl. Microbiol.*, 14, 72-76.
30. Cavadini Ch., Hertel Ch., Hammes W. P., (1996), *System. Appl. Microbiol.*, 19, 21-27.
31. Geisen R., Stander L., Leistner L., (1990), *Food Biotechnol.*, 4, 497-504.
32. Williamson C. M., Bramley A. J., Lax A. J., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 771-776.
33. Heddaeus H., Heczko P. B., Pulverer G., (1979), *J. Med. Microbiol.*, 12, 9-15.
34. Severance P. J., Kauffman C. A., Sheagren J. N., (1980), *J. Clin. Microbiol.*, 11, 724-727.
35. Knight R. T., Shlaes D. M., (1983), *J. Clin. Microbiol.*, 17, 97-99.
36. Schleifer K. H., Kloos W. E., (1975), *J. Clin. Microbiol.*, 1, 337-338.
37. Gunn B. A., Singelton F. L., Peele E. R., Colwell R. R., Keiser J. K., Kapper C. O., (1981), *J. Clin. Microbiol.*, 14, 195-200.
38. Baker J. S., (1984), *J. Clin. Microbiol.*, 19, 875-879.
39. Geary C., Stevens M., (1986), *J. Clin. Microbiol.*, 23, 1044-1045.
40. Poddar S. K., (1991), *Electrophoresis*, 12, 674-675.
41. Wilson C. R., Totten P. A., Baldwin J. N., (1978), *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 368-374.
42. Saha B., Saha D., Niygoi S., Bal M., (1989), *Anal. Bioch.*, 176, 344-349.
43. Reed K. D., Stemper M. E., Vandermause M. F., Mitchell P. D., (1993), *Am. J. Clin. Pathol.*, 100, 304-307.
44. Schuhardt V. T., Huber T. W., Pope L. M., (1969), *J. Bacteriol.*, 97, 396-401.
45. Cheung A. L., Bayer A. S., Peters J., Ward J. I., (1987), *Infec. Immun.*, 55, 843-847.
46. Lee W., Burnie J. P., (1988), *J. Med. Microbiol.*, 25, 261-268.
47. Yazdankhah S. P., Hellemann A. L., Ronningen K., Olsen E., (1998), *Vet. Microbiol.*, 62, 17-26.
48. Cavadini C., Hertel C., Hammes W. P., (1998), *J. Food. Prot.*, 61, 419-424.
49. Kerr D. E., Plaut K., Bramley A. J., Williamson C. M., Lax A. J., Moore K., Wells K. D., Wall R. J., (2001), *Nat. Biotech.*, 19, 66-70.
50. Mitra A., Hruska K. S., Wellnitz O., Kerr D. E., Capuco A. V., Wall R. J., (2003), *Transgenic. Res.*, 12, 597-605.

51. Fan W., Plaut K., Bramley A. J., Barlow J. W., Mischler S. A., Kerr D. E., (2004), *J. Dairy Sci.*, 87, 602-608.
52. Bramley A. J., Foster R., (1990), *Res. Vet. Sci.*, 49, 120-121.
53. Oldham E. R., Daley M. J., (1991), *J. Dairy Sci.*, 74, 4175-4182.
54. Daley M. J., Oldham E. R., (1992), *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 31, 301-312.
55. Dixon R. E., Goodman J. S., Koenig M. G., (1968), *Yale J. Biol. Med.*, 41, 62-68.
56. Zygmunt W. A., Tawormina P. A., (1972), *Prog. Drug. Res.*, 16, 309-333.
57. Martin R. R., White A., (1967), *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 1-8.
58. Harris R. L., Nunnery A. W., Riley H. D., (1967), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 7, 110-112.
59. Quickel K. E., Selden R., Caldwell J. R., Nora N. F., Scheffner W., (1971), *Appl. Microbiol.*, 22, 446-450.
60. Climo M. W., Patron R. L., Goldstein B. P., Archer G. L., (1998), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 42, 1355-1360.
61. Patron R. L., Climo M. W., Goldstein B. P., Archer G. L., (1999), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 43, 1754-1755.
62. Climo M. W., Ehlert K., Archer G. L., (2001), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 45, 1431-1437.
63. Kiri N., Archer G., Climo M. W., (2002), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 46, 2017-2020.
64. Dajcs J. J., Hume E. B. H., Moreau J. M., Caballero A. R., Cannon B. M., O'Callaghan R. J., (2000), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 1432-1437.
65. Dajcs J. J., Thiobodeaux B. A., Hume E. B. H., Zheng X., Sloop G. D., O'Callaghan R. J., (2001), *Curr. Eye Res.*, 22, 451-457.
66. Dajcs J. J., Thiobodeaux B. A., Girgis D. O., Shaffer M. D., Delvisco S. M., O'Callaghan R. J., (2002), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, 3712-3716.
67. von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G., (2001), *Study Group. N. Engl. J. Med.*, 344, 11-16.
68. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H., (1997), *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 505-520.
69. Kokai-Kun J. F., Walsh S. M., Canturiya T., Mond J. J., (2003), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47, 1589-1597.
70. Wu J. A., Kusuma C., Mond J. J., Kokai-Kun J. F., (2003), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47, 3407-3414.
71. Walsh S., Shah A., Mond J., (2003), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 47, 554-558.
72. Shah A., Mond J., Walsh S., (2004), *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 48, 2704-2707.