

噬菌体裂解酶——现状与未来

方圆子 王 琰 孙建和*

(上海交通大学农业与生物学院 上海市兽医生物技术重点实验室 上海 200240)

摘要: 噬菌体裂解酶是一种由 DNA 噬菌体基因编码的高特异性酶, 可高效消化细菌细胞壁。革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的结构域相似, 裂解效率高, 与抗生素具协同抗菌作用, 且不易产生耐受性菌株, 抗体等体液因子对裂解酶的裂解活性影响小, 裂解酶作为一种潜在抗感染药物具有重要的研究价值。目前已建立了多种病原菌裂解酶应用的动物模型, 在防控耐药性病原菌感染上取得重要进展。本文就噬菌体裂解酶的抗菌作用进行综述。

关键词: 噬菌体, 裂解酶

Bacteriophage Lysins: A Novel Effective Antibacterial Agents

FANG Yuan-Zi WANG Yan SUN Jian-He*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China)

Abstract: Lysins are efficient bacteria cell wall digesting enzymes encoded by DNA bacteriophage. Gram-positive bacteriophage lysins feature similar domain structure, high lytic efficiency, synergic antibacterial effect with antibiotics, rare neutralization by antibodies, less chance of developing drug-resistant strains, *et al.* The past decade has seen a considerable amount of research worldwide focused on lysin, and lysins have been used successfully in a variety of animal models to control pathogenic antibiotic resistant bacteria found on mucosal surfaces and infected tissues. The great potential of lysins as an anti-infective agent prompted this review.

Keywords: Bacteriophage, Lysin

噬菌体是特异性感染细菌的病毒。除丝状噬菌体(丝状噬菌体并不裂解宿主菌, 在宿主菌胞内增殖后以噬菌体病毒颗粒形式排出胞外)外, 绝大多数噬菌体都是通过裂解宿主细胞来结束其感染周期。小分子 RNA 和 DNA 噬菌体通过编码相关蛋白, 干扰、抑制宿主菌胞壁质合成酶^[1-3], 从而导致宿主菌胞壁溶解。而双链 DNA 噬菌体则进化出高效、特异性的裂解酶系统, 作用于细胞壁上的肽聚糖, 从而破坏细菌细胞壁, 导致细菌的裂解。

裂解酶在体内裂解细菌细胞壁, 有时还需第 2 个裂解因子——Holin 蛋白^[4]参与。Holin 蛋白是一种疏水性的跨膜蛋白, 在遗传特定阶段插入胞质膜形成非特异性的孔洞或损伤, 促使细胞壁水解酶接近它的肽聚糖靶点, 以此控制裂解酶在体内裂解细菌的时间, 具有信号肽的作用。Holin-Lysin 模型在肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和乳酸菌中普遍存在, 但在蜡样芽孢杆菌噬菌体裂解酶^[5]和李斯特菌噬菌体裂解酶 A511 中^[6], 都没有发现与细胞壁水解酶基

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(No. 200803016)

* 通讯作者: Tel: 86-21-34206926; ✉: sunjhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-05-20; 接受日期: 2009-09-15

因相关联的 Holin 基因。研究发现,芽孢杆菌噬菌体 TP21 裂解酶具有与芽孢杆菌自溶酶的信号肽序列同源性很高的 N 端,推测其 N 端本身就具有将自身引导至细胞壁靶点的功能^[1]。

科学家研究噬菌体的裂解活性已近一个世纪,虽然应用噬菌体控制感染取得了重要进展^[7,8],但直到最近才初步实现了应用裂解酶控制病原菌^[9-11]。病原菌对抗生素耐药的日益严重,大大推动了裂解酶的研究。动物试验发现^[12],在易感动物鼻腔和口腔粘膜上使用肺炎链球菌和化脓性链球菌特异性裂解酶可降低病原的感染率。纯化的特异性裂解酶,可在接触细菌数秒后将其杀死^[8,9]。例如,1000 单位(10 ng)裂解酶作用于 A 型链球菌 5 s 后,菌量减少 10^7 CFU。除化学药剂外,尚无任何已知的生物制品能够如此快速灭活细菌,彰显出噬菌体裂解酶强大的抗菌作用^[1]。尽管特异性裂解酶对革兰氏阳性细菌的作用显著,但对革兰氏阴性菌的作用尚待进一步研究。

1 裂解酶的结构

革兰氏阳性菌 DNA 噬菌体编码的裂解酶大小通常为 25 kD~40 kD。一般来说,革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的结构域相似^[13,14],具有一个决定该酶催化活性的 N-端结构域(催化域)和一个决定细胞结合位点的 C-端结构域(细胞结合域, CBD),二者之间由一个小片段链接(图 1)^[1]。序列分析表明,同一类裂解酶的催化域高度保守,而细胞结合域可变。催化域活性可能来自内- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶或 N-乙酰胞壁质酶(溶菌酶),也可能来自 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(或酰胺酶)。内- β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶和 N-乙酰胞壁质酶二者都能作用于细菌细胞壁上的半糖;肽链内切酶能作用于多肽;N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶能够水解连接糖链和肽基的酰胺键^[12,15]。最近报道了一种具有 γ -D-谷氨酰胺酰-L-赖氨酸肽链内切酶活性的酶^[16]。在某些条件下,葡萄球菌噬菌体裂解酶,拥有两个甚至三个不同的催化域^[17]。细胞结合域可与宿主细胞壁上的特定基质(通常为糖类)高效、特异结合^[18,19],这是实现高效裂解靶细菌的前提^[1]。

链球菌特异性裂解酶 PlyC 的结构与众不同,其大小约 114 kD,由重链 PlyCA(约 50 kD/条)与轻链

PlyCB(约 8 kDa/条)以 1:8 比例构成^[20]。生物化学和生物物理学研究表明, PlyC 全酶具有催化活性。

肺炎链球菌裂解酶 Cpl-1 的晶体结构及胆碱与其的结合状态已研究清楚^[21],据此推测, Cpl-1 的胆碱结合域特异性识别胆碱,引发催化域启动高效切割。裂解酶的发夹结构提示,在结合域与细菌细胞壁基质结合之前,两个结构域存在相互作用。这是否为所有裂解酶的共同特点,尚待解析更多裂解酶的晶体结构后方能判断。

基于序列比对发现,同一类裂解酶的 N-端催化域具有较高的同源性,而 C-端细胞结合域同源性低。由于细胞裂解后溢出的裂解酶可能会杀死附近子代噬菌体的潜在宿主细菌,促使裂解酶不断进化其结合域,提高亲和力^[1,22],以限制游离裂解酶的释放,提高裂解作用的特异性。

鉴于裂解酶结构域的结构和功能特点,通过嵌入不同裂解酶结构域可制备具有不同细菌特异性和催化特异性的裂解酶。实际上, Garcia 等人的研究成果非常完善地证实了这点^[14,23],替换肺炎链球菌噬菌体裂解酶的催化域,会产生一种新的酶,保持结合域不变,但切割的肽聚糖不同。提示利用该特性可设计、合成具高特异性和高效切割能力的嵌合裂解酶。

内含子与某些裂解酶有关,虽很罕见,但确实存在。最近报道在 50%的嗜热链球菌噬菌体中,自我剪接型内含子隔断了裂解酶基因^[24]。在金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶^[25]和 C 型链球菌的 C1 裂解酶中也有类似情况^[26]。



图 1 革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶结构示意图^[1]

Fig. 1 Structure of bacteriophage lysins of Gram-positive origin^[1]

注:催化域可能表现为以下酶活性:1:肽链内切酶;2:N-乙酰胞壁质酶;3:葡萄糖胺酶;4:N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶;5: γ -D-谷氨酰胺酰-L-赖氨酸肽链内切酶。

Note: Catalytic domain may have some enzyme activity as: 1: Endopeptidase; 2: N-acetylmuramidase; 3: Endo- β -N-acetylglucosaminidase; 4: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; 5: γ -D-glutaminyll-L-lysine endopeptidase.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

与革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶不同, 革兰氏阴性菌噬菌体(T4, T7, P22 等)所编码的裂解酶通常为球形蛋白, 仅有 N-端结构域, 但其亲和力高, 且结合谱更广。Yves Brieris 等人据此合成了假单胞菌噬菌体裂解酶 KZ144 和肽聚糖水解酶催化域 KMV36C 的嵌合体, 发现 KZ144 能显著增强 KMV36C 的特异性水解活性, 为研制高效、特异性裂解酶提供了新思路^[27]。

2 裂解机制

噬菌体裂解酶消化细胞壁肽聚糖, 在细胞壁上打洞从而导致细菌死亡。细菌细胞的内部高压(约 3~5 个大气压)由高度交联的细胞壁支撑, 任何对细胞壁完整性的破坏都将导致胞质溢出和最终低渗裂解。一般来说, 一种细菌生成的裂解酶只能杀死该种细菌(或亚种)。例如, 链球菌噬菌体裂解酶只能杀死特定种类链球菌, 肺炎链球菌噬菌体合成的裂解酶只能杀死肺炎链球菌^[8,9]。PlyC 可以杀死 A 型链球菌、C 型链球菌、E 型链球菌、牛乳房链球菌和马链球菌, 但对人口腔常规链球菌和其他革兰氏阳性细菌基本无作用。肺炎链球菌特异性裂解酶也有相似特点。裂解酶与抗生素作用机制不同, 抗生素通常是广谱的, 而裂解酶只杀死特定的病原生物体, 且对人类正常菌群几乎没有影响。然而, 最近也发现了某些噬菌体裂解酶具有相对广泛的裂解活性。例如, 肠球菌噬菌体裂解酶不仅杀死肠球菌, 同时也杀死其他革兰氏阳性病原体, 如化脓性链球菌、B 型链球菌和金黄色葡萄球菌, 具有广谱裂解酶作用的特征^[28], 但是, 对这些病原体的裂解活性相对低于肠球菌。

作者所在课题组在大肠杆菌 BL21 中所表达猪链球菌 2 型噬菌体 SMP 的裂解酶, 能裂解猪链球菌 7 型、9 型以及 17 株猪链球菌 2 型菌株, 具有比亲本噬菌体 SMP 更广的裂解谱, 这意味着通过基因工程和蛋白工程可以实现其更广泛的应用^[29]。此外, 经丝裂霉素 C 处理, 乳房链球菌前噬菌体基因发生变异, 重组表达后获得具有更高裂解活性的裂解酶, 提示裂解酶的获得可以采取多种途径^[1,30]。

对特定菌群的特异性和有效工作浓度是成功应用裂解酶控制感染的前提^[31,32]。遗憾的是, 在大多数情况下, 裂解酶活性低或难以大批量生产。最近有研究采用重组的金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶^[31]

在体外和小鼠模型中均能显著裂解耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌(MRSA), 并能保护经滴鼻和腹腔注射 MRSA 的小鼠, 发现 MRSA 攻毒 30 min 后, 使用裂解酶保护效果最佳^[1]。

3 影响裂解效率的因素

通常情况下, 裂解酶最适 pH 为 pH 6~7, 最适温度为 37°C, 在 47°C 时迅速钝化。其在血液中可保持活性, 但在许多其它环境条件下活性下降。此外, 抗生素、抗体水平等其他因子对裂解酶裂解效率可能具有一定的影响。最近报道 PlyC 在一系列模拟环境中(硬水、有机材料或接触非离子型洗涤剂等)可以保持全酶活性, 肯定了其作为抗菌制剂的应用潜力^[33]。

3.1 裂解酶与抗生素具协同作用^[1]

肺炎链球菌噬菌体裂解酶可以分为两类: 酰胺酶和溶菌酶。肺炎链球菌接触这两种酶中任何一种, 都将完全裂解。这两种酶 N-端催化域结构不同, 但 C-端胆碱细胞结合域类似。用 3 种不同的分析方法: 液体杀菌时间法, 纸片扩散法, 以及棋盘肉汤微稀释法均已确认, 这两种酶具有显著的协同作用^[1,34]。体内试验表明, 这两种具有不同肽聚糖特异性的裂解酶复合使用比单独使用其中任何一个都更有效^[34,35]。此外, 两种裂解酶同时应用还可显著延缓耐酶突变菌株的出现^[1]。

Cpl-1 与某些抗生素联合使用时也会产生协同作用。例如, Cpl-1 和庆大霉素联合使用能够协同杀死肺炎链球菌, 并降低青霉素最低抑菌浓度; 此外, Cpl-1 还可以与青霉素协同作用于极耐青霉素菌株^[36]。葡萄球菌特异性酶和糖肽类抗生素也具有协同作用^[31]。因此, 正确联合使用裂解酶和抗生素有助于控制耐药性细菌以及恢复使用某些抗药性已经成立的抗生素^[1]。

3.2 抗体对裂解酶的裂解效率影响小^[1]

应用裂解酶有一不能回避的问题: 中和抗体的生成是否会影响治疗期间体内裂解酶的活性。抗生素是小分子, 一般不发生免疫反应。而裂解酶, 在经粘膜或全身性系统递送过程中会激发免疫应答、产生抗体, 进而可能影响裂解酶的活性。令人欣慰的是前人的工作已清晰回答了这个问题: 采用兔高免血清可钝化 Cpl-1 对肺炎链球菌的裂解活性, 但不能完全阻滞 Cpl-1 的裂解活性^[10]。应用炭疽杆菌特异性裂解酶、化脓性链球菌特异性裂解酶和葡萄球

菌特异性裂解酶等开展的体外类似实验均得到同样结论^[31]。

为了检验体内抗体水平与酶活性的相关性,对小鼠静脉注射了3个剂量的Cpl-1,结果发现,5/6例呈现IgG阳性,效价虽低但可测出,约为1:10^[1]。免疫和未免疫对照小鼠,均静脉注射肺炎链球菌,10 h后同样静脉注射200 mg Cpl-1,结果显示,不到1 min, Cpl-1 免疫小鼠细菌浓度就降低到未免疫小鼠对照组的水平,支持了体外试验结果,即抗体对裂解酶的影响很少或几乎没有。Rashel 等人用葡萄球菌裂解酶做了类似试验,也得到了同样的结果,注射不同浓度的裂解酶未出现与推论相反的情况。目前关于机体针对病原菌所产生的抗体与病原菌特异性噬菌体裂解酶之间的关系的报道较少,Loessner 等人据其研究结果推测部分裂解酶受体可能是其宿主菌的抗原表位^[22]。

3.3 细菌不易对裂解酶产生耐受性^[1]

细菌对裂解酶不易产生耐受性。应用低浓度裂解酶处理细菌40多代均未发现耐药现象,且用裂解酶分别处理固体培养和液体培养的细菌,均未产生抗药性细菌^[8,11]。裂解酶不易产生耐受性的一个可能原因是:细菌细胞壁上的受体——胆碱是肺炎链球菌生存所必需的^[37]。如果该作用途径能被确认,那么可以针对裂解酶细胞壁受体设计抑制其合成的新型抗菌药物,理论上不易形成耐受性。

3.4 裂解效应对体内细胞因子水平的影响尚待确认

裂解酶裂解细菌后释放的细菌碎片,可能会导致体内细胞因子水平的变化。相关研究^[38,39]显示未经治疗的鼠肺炎链球菌性心内膜炎模型中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、 γ 干扰素和肿瘤坏死因子的释放增加,但是Cpl-1治疗后,体内致炎细胞因子和趋化因子显著降低。在此前研究中,静脉注射了高浓度的裂解酶来治疗动物,产生了大量细菌细胞壁碎片,而在Kengatharan 等人^[40]的研究中,每隔12 h给药,在细菌细胞壁上打洞,发生了炎症,这可能与裂解酶剂量相关。

目前,关于裂解酶对胞内细菌作用的报道较少。

4 裂解酶的应用

4.1 体外应用模型

为了测试裂解酶杀死粘膜表面细菌的能力,建

立了动物黏膜定植模型,如:肺炎链球菌的鼻腔模型^[8],化脓性链球菌口腔定植模型^[9],以及B型链球菌的阴道模型^[41]。在3个模型中,分别对动物进行细菌感染,并以单剂量细菌特异性裂解酶处理,2 h~4 h后检测发现细菌数量迅速减少。这些结果提示该酶可应用于特定易感人群^[1]。

4.2 体内应用模型

虽然裂解酶半衰期短(约15 min~20 min)^[10],但尚有充足的时间来观察疗效^[10,35]。小鼠静脉注射感染14型肺炎链球菌,1 h后用2.0 mg的Cpl-1处理,48 h内全部存活,而对照组小鼠平均存活25 h,48 h后仅20%存活。经过对小鼠的血液和组织培养,发现部分Cpl-1处理过的小鼠在48 h细菌分离为阴性,提示要彻底消除动物体内病原菌,还须进一步使用裂解酶。攻毒动物腹腔注射裂解酶也得到了类似的结果^[31,35]。裂解酶半衰期短暂,体内应用时可采用聚乙二醇或IgG的Fc处理裂解酶以延长其在体内的作用时间^[1]。最近有研究表明,噬菌体裂解酶可成功应用于鞘内注射治疗脑膜炎^[42]和静脉注射治疗心内膜炎^[41],二者均使用了改良过的长效裂解酶。

裂解酶应用所面临的最终挑战是,其能否治愈既定感染。为了回答这一问题,建立了肺炎小鼠模型,小鼠经滴鼻感染肺炎链球菌后,采取腹腔注射Cpl-1进行治疗^[39]。通过临床测试和肺部病理学的观察,发现攻毒24 h后,小鼠感染烈性肺炎链球菌。随后进行治疗,且每隔12 h注射一次,结果显示100%的小鼠存活并快速恢复。该研究表明,Cpl-1能显著降低肺部和血液中的细菌数量。

由于裂解酶能够迅速杀死病原菌,具有在防治炭疽等细菌武器中发挥作用的潜能^[11]。 γ 噬菌体是一类高特异性炭疽芽孢杆菌噬菌体^[43],能够分泌裂解酶。纯化的 γ 噬菌体裂解酶(又称为PlyG),对10株分离自世界各地的炭疽芽孢杆菌菌株均具杀灭作用。此外,PlyG裂解酶对5个缺失荚膜或毒素相关质粒的突变炭疽芽孢杆菌也有致死作用。根据小鼠体内试验表明,延长裂解酶半衰期、采用高剂量、多次静脉注射PlyG均可提高存活率^[1]。

流感之类的上呼吸道病毒感染常继发细菌感染,导致发病率和死亡率上升。这些并发症的主要病原菌为金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌,这些病原体已形成了莫匹罗星和多链霉素耐药性。在一个小鼠中耳炎模型中,小鼠感染流感病毒后,继发感染肺

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

炎链球菌, 80%小鼠自然发生中耳炎, 如果在小鼠感染流感前, 注射 Cpl-1 裂解酶可有效防止中耳炎的发生^[44], 保护率达 100%。因此, 在流感流行季节采用裂解酶预防易感人群, 抑制肺炎链球菌和葡萄球菌增殖, 可有效地减少这些细菌的继发感染^[1]。

5 展望

作为一种生物蛋白, 裂解酶易于批量生产、提纯, 高效且不影响机体正常菌群, 尚未发现残留和耐药问题, 因此, 噬菌体裂解酶具有广泛的应用潜能。当然, 对裂解酶的广泛认可和临床应用还有一段路要走。应用裂解酶治疗感染是未来一个主要的研究方向, 同时, 像研发疫苗一样, 开发应用裂解酶的预防技术将是另一个重要方向。在治疗感染上今后的任务是在揭示裂解酶基本活性单元的基础上, 充分应用裂解酶已有特性并不断改进, 利用基因工程和蛋白质工程, 诱变前噬菌体基因, 替换裂解酶基因和修饰结构域, 合成具不同裂解活性的裂解酶嵌合体, 实现裂解酶的改造与优化, 达到高产、高效、广谱、稳定等目标, 或许有一天, 噬菌体裂解酶将是对抗致病菌不可或缺的武器。

参 考 文 献

- [1] Fischett VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opi Microbiol*, 2008, **11**(5): 393–400.
- [2] Young R, Wang I-N, Roof WD. Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends in Microbiol*, 2000, **8**: 120–128.
- [3] Bernhardt TG, Wang IN, Young R, *et al.* A protein antibiotic in the phage Q-beta virion: diversity in lysis targets. *Science*, 2001, **292**: 2326–2329.
- [4] Wang I-N, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**: 799–825.
- [5] Loessner MJ, Maier SK, Daubek-Puza H, *et al.* Three *Bacillus cereus* bacteriophage endolysins are unrelated but reveal high homology to cell wall hydrolases from different bacilli. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 2845–2851.
- [6] Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol microbial*, 1995, Jun, **16**(6): 1231–1241.
- [7] Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, *et al.* Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, 2005, **11**: 211–219.
- [8] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, **294**: 2170–2172.
- [9] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A Streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(7): 4107–4112.
- [10] Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*, 2003, **71**: 6199–6204.
- [11] Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Science*, 2002, **418**: 884–889.
- [12] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev*, 1992, **56**: 430–481.
- [13] Diaz E, Lopez R, Garcia JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 8125–8129.
- [14] Garcia P, Garcia JL, Garcia E, *et al.* Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene*, 1990, **86**: 81–88.
- [15] Loessner MJ. Bacteriophage endolysins—current state of research and applications. *Curr Opi Microbiol*, 2005, **8**: 480–487.
- [16] Pritchard DG, Dong S, Baker JR, *et al.* LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 7150–7154.
- [17] Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, *et al.* Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage phi11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 15847–15856.
- [18] Lopez R, Garcia E, Garcia P, *et al.* The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist*, 1997, **3**: 199–211.
- [19] Garcia E, Garcia JL, Lopez R, *et al.* Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 914–918.
- [20] Nelson D, Schuch R, Fischetti VA, *et al.* PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 10765–10770.
- [21] Hermoso JA, Monterroso B, Garcia P, *et al.* Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*, 2003, **11**: 1239–1249.
- [22] Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, *et al.* C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Micro-*

- biol*, 2002, **44**: 335–349.
- [23] Weiss K, Laverdiere M, Lovgren M, *et al.* Group A *Streptococcus carriage* among close contacts of patients with invasive infections. *Am J Epidemiol*, 1999, **149**: 863–868.
- [24] Foley S, Bruttin A, Brussow H. Widespread distribution of a group I intron and its three deletion derivatives in the lysin gene of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *J Virol*, 2000, **74**: 611–618.
- [25] Flaherty SO, Coffey A, Meaney W, *et al.* Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting Gram-positive bacteria with a low G + C content. *J Bacteriol*, 2004, **186**(9): 2862–2871.
- [26] Nelson D, Schuch R, Fischetti VA, *et al.* Genomic sequence of C1, the first streptococcal phage. *J Bacteriol*, 2003, **185**(11): 3325–3332.
- [27] Yves Briers, Mathias Schmelcher, Martin J Loessner, *et al.* The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **383**(2): 187–191.
- [28] Yoong P, Schuch R, Fischetti VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*, 2004, **186**: 4808–4812.
- [29] Wang Y, Sun JH, Lu CP. Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for Swine *Streptococci*. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, **197**: 1519–1522.
- [30] Laura K Celia, Daniel Nelson, David E Kerr. Characterization of a bacteriophage lysis (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Vet Microbio*, 2008 **130**(1–2): 107–117.
- [31] Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, *et al.* Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis*, 2007, **196**: 1237–1247.
- [32] O’Flaherty S, Coffey A, Meaney W, *et al.* P: The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 2005, **187**: 7161–7164.
- [33] Hoopes JT, Stark CJ, Kim HA, *et al.* Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. *Appl Environ Microbiol*, 2009, **75**(5): 1388–1394.
- [34] Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, **47**: 375–377.
- [35] Jado I, Lopez R, Garcia E, *et al.* Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother*, 2003, **52**: 967–973.
- [36] Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 1225–1228.
- [37] Garcia P, Garcia E, Lopez R, *et al.* Inhibition of lysis by antibody against phage-associated lysin and requirement of choline residues in the cell wall for progeny phage release in *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Microbiol*, 1983, **8**: 137–140.
- [38] Entenza JM, Loeffler JM, Fischetti VA, *et al.* Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 4789–4792.
- [39] Reppe K, Tschernig T, Luhrmann A, *et al.* Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, **40**(4): 474–481.
- [40] Kengatharan KM, De KS, Robson C, *et al.* Mechanism of Gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med*, 1998, **188**: 305–315.
- [41] Cheng Q, Nelson D, Fischetti VA, *et al.* Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**: 111–117.
- [42] Grandgirard D, Loeffler JM, Fischetti VA, *et al.* Phage lytic enzyme cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*, 2008, **197**: 1519–1522.
- [43] Watanabe T, Morimoto A, Shiomi T. The fine structure and the protein composition of gamma phage of *Bacillus anthracis*. *Can J Microbiol*, 1975, **21**: 1889–1892.
- [44] McCullers JA, Amy R Iverson, Vincent A Fischetti, *et al.* Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*, 2007, **3**: e28.