

Received: 2014.08.11  
Accepted: 2014.11.19  
Published: 2015.01.23

## Liza komórek bakteryjnych w procesie uwalniania bakteriofagów – kanoniczne i nowo poznane mechanizmy\*

### Lysis of bacterial cells in the process of bacteriophage release – canonical and newly discovered mechanisms

Wioleta M. Woźnica<sup>1,3</sup>, Joanna Bigos<sup>2,3</sup>, Małgorzata B. Łobocka<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

<sup>2</sup>Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

<sup>3</sup>Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii SGGW, Warszawa

#### Streszczenie

Uwalnianie z zainfekowanej bakterii namnożonych w niej bakteriofagów jest warunkiem rozprzestrzenienia się zakażenia. Tylko fagi filamentokształtne są wydzielane z komórki, nie powodując jej destrukcji. Uwalnianie pozostałych wiąże się z lizą i śmiercią bakterii. Ważne jest więc poznanie fagowych funkcji litycznych w celu ich wykorzystania w walce z patogennymi bakteriami. Bakteriofagi o małych genomach w postaci RNA lub DNA kodują pojedyncze białka zwane amurynami, powodujące lizę przez inhibicję syntezy ściany komórkowej. Dominujące w środowisku bakteriofagi ogonkowe, o genomach w postaci dwuniciowego DNA, kodują enzymy zwane endolizynami, przyczyniające się do lizy przez trawienie peptydoglikanu ściany. Endolizyny niemające sekwencji sygnałowych nie mogą samodzielnie przedostać się przez błonę cytoplazmatyczną. Dostęp do peptydoglikanu, przez tworzenie dużych porów w błonie, tzw. „dziur”, umożliwiają im białka błonowe zwane holinami. Niektóre endolizyny do transportu przez błonę nie wymagają holin, dzięki obecności na N-końcu tzw. sekwencji SAR. Umożliwia ona ich transport z udziałem białek bakteryjnego systemu *sec*. Nie jest jednak odtrawiana, przez co endolizyny te w postaci nieaktywnej pozostają uwięzione w błonie. Ich uwolnienie skorelowane z aktywacją zachodzi w wyniku depolaryzacji błony i zależy od białek zwanych pinholinami. Pinholiny tworzą w błonie pory zbyt małe do transportu przez nią endolizyn, ale wystarczające do jej depolaryzacji. Białka zwane antyholinami precyzyjnie regulują czas rozpoczęcia lizy przez blokowanie działania holin do czasu zakończenia morfogenezy fagów. W uwalnianiu z komórek bakteriofagów bakterii Gram-ujemnych uczestniczą nowo zidentyfikowane białka zwane spaninami. Powodują destrukcję zewnętrznej błony komórkowej przez jej połączenie z błoną cytoplazmatyczną. Jest to możliwe po uszkodzeniu peptydoglikanu dzielącego obie błony przez endolizynę i zapewnienie szybkie zakończenie lizy.

#### Słowa kluczowe:

bakteriofag • sekwencja SAR • endolizyna • holina • liza komórkowa

#### Summary

The release of phage progeny from an infected bacterium is necessary for the spread of infection. Only helical phages are secreted from a cell without causing its destruction. The release of remaining phages is correlated with bacterial lysis and death. Thus, the understanding of

\* Praca przygotowana w ramach realizacji Zadania 7 projektu POIG.01.03.01-00-003/08 oraz badań z funduszu statutowego Samodzielnego Zakładu Biologii Mikroorganizmów Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW.

phage lytic functions is crucial for their use in the fight with bacterial pathogens. Bacteriophages with small RNA or DNA genomes encode single proteins which are called amurins and cause lysis by the inhibition of cell wall synthesis. Bacteriophages of double-stranded DNA genomes, which dominate in the environment, encode enzymes that are called endolysins and contribute to lysis by the cleavage of cell wall peptidoglycan. Endolysins that do not contain signal sequences cannot pass the cytoplasmic membrane by themselves. Their access to peptidoglycan is provided by membrane proteins – holins, which can form in the membrane large pores, that are called “holes”. Some endolysins do not require holins for their transport, owing to the presence of the so called SAR sequence at their N-terminus. It enables their transport through the membrane by the bacterial *sec* system. However, it is not cleaved off, and thus these endolysins remain trapped in the membrane in an inactive form. Their release, which is correlated with the activation, occurs as a result of membrane depolarization and depends on proteins that are called pinholins. Pinholins form in membrane pores that are too small for the passage of endolysins but sufficient for membrane depolarization. Proteins that are called antiholins regulate the timing of lysis, through the blockage of holins action until the end of phage morphogenesis. Additionally, newly identified lytic proteins, spanins, participate in the release of progeny phages from Gram-negative bacteria cells. They cause the destruction of outer cell membrane by its spanning with the cytoplasmic membrane. This is possible after the endolysin-mediated destruction of peptidoglycan, which separates both membranes, and ensures the fast completion of lysis.

**Key words:** bacteriophage • SAR domain • endolysin • holin • cell lysis

**Full-text PDF:** <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1137496>

**Word count:** 4623

**Tables:** –

**Figures:** 4

**References:** 78

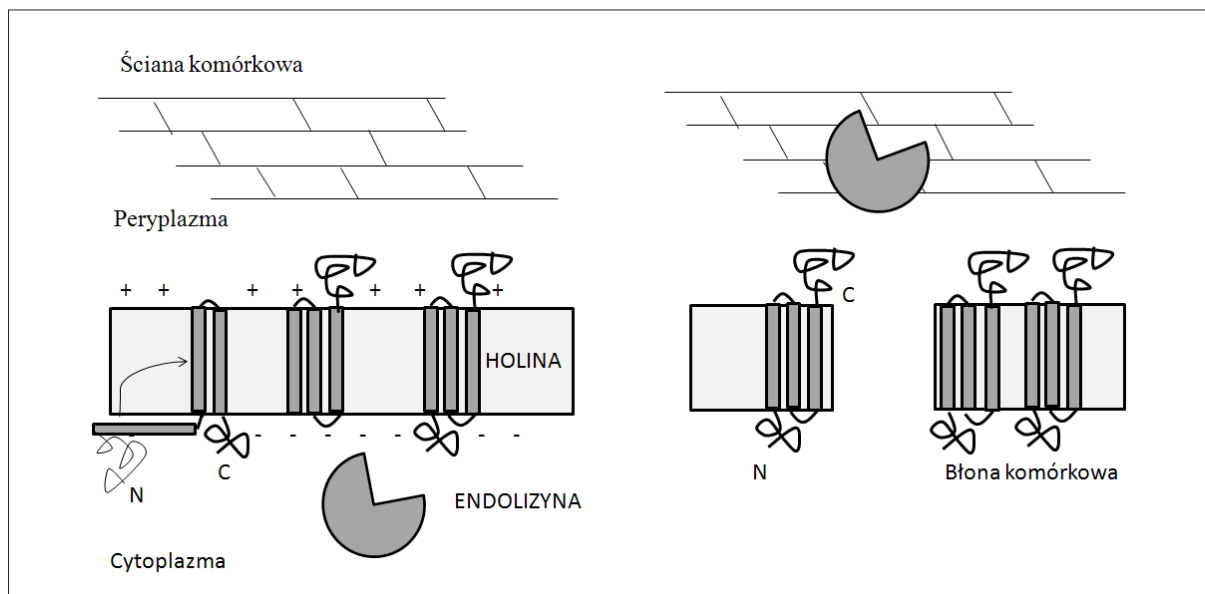
**Adres autorki:** dr hab. Małgorzata B. Łobocka, Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, e-mail: [lobocka@ibb.waw.pl](mailto:lobocka@ibb.waw.pl)

**Wykaz skrótów:** **CBD** – domena wiążąca ścianę komórkową; **GlcNAc** – N-acetyloglukozamina; **MurNAc** – kwas N-acetylmuraminowy; **PG** – peptidoglikan; **PMF** – gradient protonowy błony komórkowej; **SAR** – N-terminalna sekwencja sygnałowa.

## WSTĘP

Odkryte niezależnie przez trzech badaczy: Ernesta Hankina (1896), Fredericka Tworta (1915) i Félix d’Hérelle (1917) bakteriofagi to wirusy infekujące bakterie i niegroźne dla komórek eukariotycznych. Ich nazwa wzięła się z dosłownego tłumaczenia greckich słów *phagein* i *baktērion*, co znaczy „zjadacz bakterii” [48]. Bakteriofagi, w zależności od sposobu przebiegu infekcji, dzieli się na fagi obligatoryjnie lityczne (nazywane inaczej wirulentnymi lub zjadliwymi) i fagi łagodne (inaczej lizogenne) [29]. Fagi wirulentne po infekcji namnażają się w komórce wyłącznie przez rozwój lityczny, doprowadzając do jej lizy - uszkodzenia osłon komórkowych i uwolnienia zawierającej potomne fagi zawartości. Rozwój lityczny, rozpoczynający się po adsorpcji faga do komórki i wprowadzeniu do jej wnętrza fagowego kwasu nukleinowego,

składa się z kilku etapów zachodzących w ściśle określonych przedziałach czasowych: replikacji genomu oraz syntezy transkryptów i białek fagowych, dojrzewania i składania wirionów, lizy komórki bakteryjnej i uwolnienia wirionów potomnych. Fagi łagodne, oprócz namnażania się przez rozwój lityczny, mogą inicjować stan lizogenii. W komórkach lizogenów fag egzystuje w postaci DNA, zwanego profagiem. Większość bakteriofagów łagodnych (np. fag  $\lambda$ ) lizogenizuje komórki przez integrację DNA (profaga) do chromosomu. Mniej liczne (np. fag P1) mogą egzystować w komórkach w postaci plazmidu. Oba typy profagów są powielane w cyklu komórkowym, odpowiednio wraz z replikacją chromosomu lub przez replikację inicjowaną z rejonu „origin” replikacji plazmidu-profaga. Lizogenia może trwać przez wiele generacji, tak długo jak wewnętrzkomórkowe stężenie aktywnej postaci represora funkcji litycznych faga wystarcza do



Ryc. 1. Schemat działania systemu holina – endolizyna (wg [72] zmodyfikowano)

hamowania transkrypcji wczesnych genów związanych z rozwojem litycznym. Zmniejszenie stężenia aktywnej postaci represora zapoczątkowuje rozwój lityczny, który przebiega podobnie jak u fagów obligatorycznie wirulentnych i kończy się lizą komórki.

Liza komórki bakterii, w procesie uwalniania fagów potomnych, prowadzi do jej śmierci. Dlatego białka fagowe odpowiedzialne za proces lizy są postrzegane jako przyszła alternatywa dla innych środków przeciwbakteryjnych, szczególnie w zwalczaniu antybiotykoopornych bakterii. Poznanie mechanizmów ich działania przybliży chwilę, w której będą mogły wejść w skład powszechnie wykorzystywanych środków odkażających lub leczniczych.

#### STRATEGIE LIZY KOMÓRKI BAKTERYJNEJ Z UDZIAŁEM BIAŁEK FAGOWYCH

Uwolnienie się z komórki namnożonych w niej bakteriofagów jest niezbędne do zakażenia przez nie następnymi bakteriami. Główną barierą do pokonania jest warstwa peptydoglikanu - mocna, stabilna struktura, która przeciwdziała panującemu w cytoplazmie ciśnieniu, chroniąc komórkę przed lizą osmotyczną i uszkodzeniami mechanicznymi [77]. W ewolucji bakteriofagów rozwinęły się dwie strategie prowadzące do uwolnienia z komórki namnożonych w niej fagów [58]. Fagi filamentokształtne (w tym M13) ze względu na swoją unikalną morfologię i morfogenezę są zdolne do przechodzenia przez osłony bakteryjne, nie powodując ich destrukcji zagrażającej życiu komórki. Wszystkie pozostałe fagi kodują białka powodujące lizę komórki bakteryjnej [77]. Zależnie od rodzaju faga liza jest wynikiem inhibicji syntezy peptydoglikanu lub jego uszkodzenia przez enzymatyczne cięcia [11].

Małe bakteriofagi lityczne (np. *Microviridae*, *Leviviridae*, *Alloleviridae*), których genom stanowi jednoniciowe (ss) RNA

lub DNA do około 6 tys. par zasad, kodują pozbawione aktywności muralitycznej, pojedyncze białka lityczne zwane amurynami i zdolne do inhibicji syntezy peptydoglikanu [5,6]. Przykładem jest białko lityczne E faga  $\phi$ X174 (ssDNA *Microvirus*). Wywołuje ono lizę przez inhibicję aktywności *MraY*, enzymu katalizującego syntezę prekursora mureiny [78]. Według analogicznego modelu działają najprawdopodobniej białka lityczne pozostałych fagów z tej grupy, powodujące inhibicję aktywności enzymów uczestniczących w różnych etapach syntezy peptydoglikanu [5].

Większe bakteriofagi, o genomie w postaci dwuniciowego DNA, kodują co najmniej dwa białka lityczne konieczne do wywołania lizy komórki bakteryjnej: holinę (od hole - dziura) i endolizynę (białko o aktywności muralitycznej) [16,57,77]. W końcowym etapie rozwoju litycznego faga holina powoduje permeabilizację błony komórkowej, umożliwiając w ten sposób endolizynie przedostanie się z cytoplazmy do peryplazmy i uszkodzenie ściany komórkowej. Większość endolizyn jest bowiem pozbawiona sekwencji sygnałowej, która umożliwiłaby transport enzymu przez błonę cytoplazmatyczną (ryc. 1) [69].

Niektóre dsDNA bakteriofagi kodują endolizyny wyposażone w specyficzne N-terminalne sekwencje sygnałowe, zwane sekwencjami SAR [15]. Przemieszczanie się tych endolizyn do peryplazmy nie wymaga udziału holin, chociaż podczas ich nieobecności liza zachodzi mniej wydajnie. Być może dlatego bakteriofagi kodujące tego typu endolizyny kodują też holinę [74].

System holina–endolizyna, przez długi czas był uznawany za uniwersalny i wystarczający do zajścia lizy bakterii w procesie namnażania faga. Według klasycznego paradygmatu, stworzonego głównie na podstawie badań nad fagiem  $\lambda$ , zarówno holinę jak i endolizyny ulegają eks-

presji w końcowym etapie namnażania faga [13]. Funkcje tych białek są jednak ściśle kontrolowane.

Najważniejszym momentem podlegającym regulacji w rozwoju litycznym faga jest czas, w którym dochodzi do zapoczątkowania lizy komórki gospodarza [77]. Zbyt wczesna liza, zapoczątkowana przed zakończeniem morfogenezy fagów, może prowadzić do uwolnienia wirionów niekompletnych, a więc niezdolnych do infekcji. Jednak zbyt długie przetrzymywanie dojrzałych wirionów w komórce opóźnia proces infekowania przez nie nowych gospodarzy, zwiększając możliwość porażki w konkurencji z innymi fagami. Istnieje zatem presja ewolucyjna w kierunku optymalizacji czasu lizy [68]. Warunkiem optymalizacji jest również to, by liza była szybka. Długi czas między zapoczątkowaniem a zakończeniem lizy „upośledzałby” ewolucyjnie fagi w stosunku do ich konkurentów, podobnie jak opóźnienie początku lizy [77].

Precyzyjna regulacja czasu lizy jest możliwa dzięki białkom pełniącym rolę negatywnych regulatorów holin (tzw. antyholin) oraz - w przypadku fagów bakterii Gram-ujemnych - czynnikiem destabilizującym zewnętrzną błonę komórkową [69]. Ich funkcje najlepiej poznano na przykładzie bakteriofaga  $\lambda$ .

Kaseta lityczna bakteriofaga  $\lambda$  składa się z czterech genów: *R*, *S*, *Rz* i *Rz1*, transkrybowanych z pojedynczego, późnego promotora *pR'* [28]. Geny kodujące holinę i endolizynę, odpowiednio *S* i *R*, stanowią w warunkach laboratoryjnych minimum konieczne do wywołania lizy, a dodatkowy produkt kodującego holinę genu *S*, antyholina, zapewnia zapoczątkowanie lizy w zaprogramowanym czasie [28]. Okazuje się jednak, że dalsze geny operonu, *Rz* i *Rz1*, są wymagane do przerwania ciągłości błony zewnętrznej, co ujawnia się, gdy błona jest stabilizowana przez kationy dwuwartościowe, uniemożliwiając komórce z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową rozpad [7,28,69]. Geny: *Rz* i znajdujący się w obrębie jego sekwencji gen *Rz1*, kodują odpowiednio białko błony cytoplazmatycznej i lipoproteinę błony zewnętrznej [9,20]. W razie ich braku, w obecności kationów dwuwartościowych, komórki nie lizują, lecz tworzą ograniczone zewnętrzną błoną formy sferyczne [7]. Są one jednak tak delikatne, że mogą rozrywać się spontanicznie, np. po wstrząśnięciu hodowli. Dlatego w badaniach nad lizą komórek prowadzonych standardowo w wytrząsanych hodowlach bakterii udział tych białek w procesie lizy przez długi czas pozostał niezauważony.

Podczas rozwoju litycznego faga  $\lambda$ , białka *Rz* i *Rz1* akumulują się odpowiednio w błonie cytoplazmatycznej oraz błonie zewnętrznej i dzięki interakcji C-terminalnych domen tworzą kompleksy [9]. Powoduje to fuzję obu błon i zakłóca ich strukturę. Ze względu na funkcję łączącą błony, białka te oraz ich analogi określa się w literaturze mianem spanin (span – łączyć, spinać), z wyróżnieniem, *Rz* jako i-spaniny, a *Rz1* jako o-spaniny [8,9]. Utworzenie fuzji między nimi jest możliwe dopiero po przerwaniu struktury peptydoglikanu uniemożliwiają-

cego kontakt między obydwoma błonami [75]. Dzięki uszkodzeniu struktury błony zewnętrznej synchronicznie z rozerwaniem ściany komórkowej spaniny gwarantują zajście lizy w optymalnym czasie. Zwykle podczas wzrostu bakterii w naturalnych środowiskach brak funkcji spanin powoduje zablokowanie lizy przez uwięzienie dojrzałych wirionów w sferycznych pozostałościach obumarłych komórek ograniczonych zewnętrzną błoną komórkową. Dlatego od niedawna uważa się spaniny za białka niezbędne do zajścia lizy poza warunkami laboratoryjnymi.

Analiza dostępnych w 2007 r. kompletnych sekwencji genomów fagowych ujawniła w przypadku większości z nich pary genów mogących kodować odpowiednio i-spaninę i o-spaninę [75]. Różnorodność sekwencji kodowanych przez nie par białek pozwoliła na ich klasyfikację aż do 8. rodzin. U niektórych bakteriofagów, np. u faga T1, zamiast pary genów mogących kodować i-spaninę i o-spaninę wykryto pojedyncze geny kodujące lipoproteinę błony zewnętrznej o C-terminalnej domenie zdolnej do wbudowywania się do błony cytoplazmatycznej. Okazało się też, że geny te komplementują defekt lizy mutantu faga  $\lambda$  pozbawionego genów *RzRz1*. Kodowane przez nie białka dla odróżnienia od i-spanin i o-spanin nazwano u-spaninami (unimolecular spanins). Najprawdopodobniej u-spaniny w nieuszkodzonych komórkach funkcjonują jako białka błony zewnętrznej i dopiero uszkodzenie poptydoglikanu przez endolizynę umożliwia wbudowanie się ich C-terminalnych domen do błony cytoplazmatycznej, powodując w ten sposób połączenie obu błon.

## ENDOLIZYNY – STRUKTURA I AKTYWNOŚĆ

Termin endolizyny użyto po raz pierwszy w 1958 r. do określenia kodowanych przez bakteriofagi hydrolaz peptydoglikanu, które są syntetyzowane w bakteriach zainfekowanych fagiem, w późnym etapie rozwoju faga i umożliwiają uwolnienie namnożonych fagów w wyniku lizy [31,36]. Powinny się zatem różnić od lizyn płytki podstawowej bakteriofagów – enzymów, które stanowią integralną część wirionu i miejscowo nadtrawiają peptydoglikan podczas etapu penetracji osłon komórkowych przez infekującego faga [11]. Rzeczywiście, u większości fagów funkcje endolizyn i lizyn płytki podstawowej pełnią różne białka [12,40,41]. Znane są jednak bakteriofagi, np. gronkowcowy fag MR11, w przypadku których funkcje endolizyny i enzymu litycznego płytki podstawowej pełni jedno białko [54].

Prawie wszystkie endolizyny są syntetyzowane jako pojedyncze polipeptydy, włączając endolizyny fagów *Streptococcus* i *Staphylococcus*, których geny często są przerwane przez samowycinające się introny grupy I [3,25,44]. Wyjątkiem jest multimeryczne (wielopodjednostkowe) białko PlyC (endolizyna faga C1, infekującego szczepu *Streptococcus* grupy C), będące produktem dwóch różnych genów, *plyCA* i *plyCB* [43]. Co więcej, holozym PlyC składa się z ośmiu podjednostek PlyCB przypadających na pojedynczą podjednostkę PlyCA.

## Organizacja strukturalna endolizyn fagowych

Warstwa peptydoglikanu bakterii Gram-ujemnych, która leży w przestrzeni peryplazmatycznej otoczona zewnętrzną błoną komórkową, jest stosunkowo cienka i pozbawiona białek powierzchniowych czy węglowodanów [64]. W wyniku tego lizyny fagów infekujących Gram-ujemnych gospodarzy są w większości prostymi, globularnymi białkami o masie 15-20 kDa, na które typowo składa się jedynie domena katalityczna [44]. Są jednak wyjątki, na przykład dwie endolizyny fagów *Pseudomonas aeruginosa* (KZ144 i EL188) wykazują strukturę modułową. Składają się z N-końcowej domeny wiążącej substrat i C-końcowej domeny katalitycznej. Cecha ta początkowo była zarezerwowana dla endolizyn fagów bakterii Gram-dodatnich i to wyłącznie w odwrotnym układzie, ale występuje również w kilku bakteryjnych enzymach muralitycznych [14,15].

W odróżnieniu od bakterii Gram-ujemnych, bakterie Gram-dodatnie nie mają ochronnej, zewnętrznej błony komórkowej [64]. Zamiast tego ich ściana komórkowa jest gruba, złożona z wielu warstw peptydoglikanu (do 40), wysoce usieciowana i udekorowana przez powierzchniowe węglowodany i białka [44]. Przypuszcza się, że dlatego endolizyny fagów bakterii Gram-dodatnich zazwyczaj wykazują budowę modułową. Oprócz domeny katalitycznej, która tnie wiązania w obrębie peptydoglikanu, zawierają tzw. domenę wiążącą, umożliwiającą swoiste gatunkowo wiązanie do węglowodanowego epitopu w ścianie komórkowej bakterii [30].

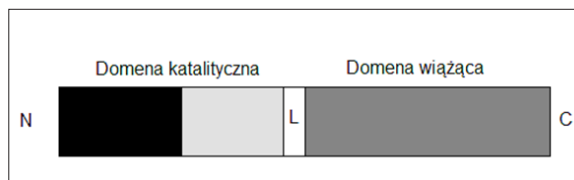
Wysokie powinowactwo domeny wiążącej do bakteryjnego peptydoglikanu może mieć znaczenie podczas kontroli tempa dyfuzji endolizyn w środowisku. Komórki, które nie są jeszcze zainfekowane fagiem, mogą być bowiem zabite przez uwolnione w wyniku lizy sąsiadujących komórek cząsteczki endolizyny [36]. Mogłoby to ograniczać następne zakażenia, przebiegające z udziałem fagów potomnych.

Dla fagów bakterii Gram-ujemnych, ze względu na obecność zewnętrznej błony komórkowej chroniącej peptydoglikan ich gospodarzy, nabycie specyficznej domeny wiążącej nie jest warunkiem koniecznym, aby zapobiec przedwczesnej lizie potencjalnych, nowych komórek gospodarza. Mogłoby to tłumaczyć mniejszą presję ewolucyjną w kierunku powstania tej domeny. Ponadto, zdecydowanie mniej złożona warstwa peptydoglikanu bakterii Gram-ujemnych może nie wymagać tak dobrego zakotwiczenia enzymu, jak wielowarstwowy peptydoglikan ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich [14].

## Aktywność muralityczna endolizyn fagowych

Endolizyny muszą spełniać dwie podstawowe funkcje: rozpoznanie substratu i enzymatyczna hydroliza wiązań peptydoglikanu. W przypadku endolizyn fagów bakterii Gram-dodatnich oraz niektórych endolizyn bakterii Gram-ujemnych połączenie wysokiej specyficzności rozpoznawania substratu z wysoką aktywnością enzymatyczną jest możliwe dzięki połączeniu odrębnych struktural-

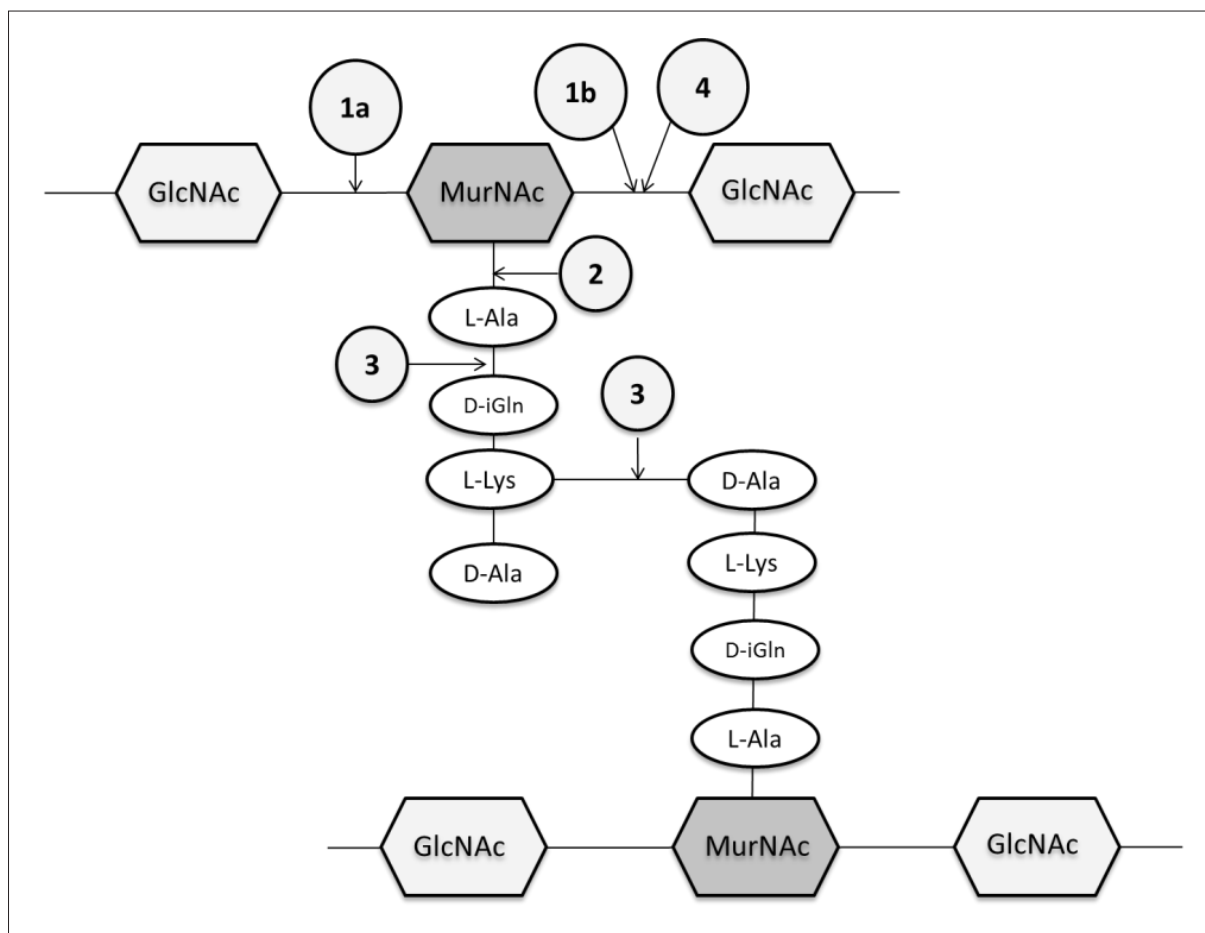
nie domen białkowych, zaangażowanych w te funkcje [36]. W niektórych przypadkach, szczególnie u lizyn fagów gronkowcowych, dwie, a nawet trzy odmienne domeny katalityczne mogą być połączone z pojedynczą domeną wiążącą [42]. Zazwyczaj domenę katalityczną od domeny wiążącej oddziela krótka, elastyczna sekwencja łącznikowa (ryc. 2) [24].



Ryc. 2. Struktura endolizyn fagów bakterii Gram-dodatnich; N – końcowa domena katalityczna (różnymi kolorami oznaczono dwie, odmienne domeny katalityczne), L – sekwencja łącznikowa, C – końcowa domena wiążąca ścianę komórkową (CBD) (wg [24] zmodyfikowano)

Peptydoglikan (PG) jest zbudowany z naprzemiennie występujących reszt N-acetyloglukozaminy (GlcNAc) i kwasu N-acetylmuraminowego (MurNAc), połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym [19]. U większości bakterii grupy aminowe tych cukrów ulegają acetylacji, natomiast grupy mleczanowe przy węglu C3 w kwasie muraminowym umożliwiają przyłączenie bocznych łańcuchów peptydowych. Z tych elementów powstaje wielkocząsteczkowy polisacharydowo-peptydowy polimer, odgraniczający od środowiska komórki bakterii Gram-dodatnich lub umiejscowiony w przestrzeni peryplazmatycznej bakterii Gram-ujemnych. Jego grubość u *E. coli* wynosi 1-3 nm. Ze względu na zakonserwowaną strukturę bakteryjnego peptydoglikanu, liczba typów wiązań kowalencyjnych mogących stanowić cel endolizyn lub innych enzymów trawiących PG jest ograniczona. Domena katalityczna tych enzymów wykazuje zdolność rozszczepiania jednego z czterech głównych wiązań w PG. Ze względu na tę aktywność endolizyny podzielono na cztery główne grupy: glikozydazy (1), amidohydrolazy (2), endopeptydazy (3) i lityczne transglikozyazy (4) (ryc. 3) [1,44].

Glikozydazy trawią wiązania między kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą w węglowodanowych łańcuchach PG. Dzielą się na dwa typy. Enzymy pierwszego typu, określane jako N-acetyloglukozaminidazy, hydrolizują wiązanie  $\beta$ -1,4-glikozydowe peptydoglikanu, za końcem GlcNAc [23,44]. Ten rodzaj aktywności jest często spotykany wśród bakteryjnych autolizyn i, z wyjątkiem endolizyny faga LambdaSa2, nie jest związany z endolizynami fagowymi [44,53]. Drugim typem glikozydaz są N-acetylmuramidazy, hydrolizujące wiązania glikozydowe na końcu MurNAc. Enzymy te, określane również jako 'muramidazy' lub 'lizozyminy' występują zarówno wśród lizyn pochodzenia bakteryjnego, jak i wśród endolizyn fagowych, np. w endolizynie faga B30, infekującego paciorkowce  $\beta$ -hemolityczne z grupy A, B, C, E i G czy endolizynie Cpl-1 fagów zakażających pneumokoki [1,26].



Ryc. 3. Docelowe miejsca działania na peptydoglikan endolizyn o różnej aktywności enzymatycznej: 1a) N-acetylglukozaminidazy; 1b) N-acetylmuramidazy; 2) amidohydrolazy; 3) endopeptydazy; 4) lityczne transglikozylazy. Na przykładzie struktury peptydoglikanu *Streptococcus pneumoniae* (wg [30] zmodyfikowano)

Drugą grupę hydrolaz peptydoglikanu stanowią amidohydrolazy (amidazy) - enzymy trawiące wiązania amidowe między MurNAc, a resztą peptydową (L-alaniną) bakteryjnego peptydoglikanu [38]. Aktywność ta znacznie częściej występuje w przypadku endolizyn fagowych niż lizyn pochodzenia bakteryjnego [44]. Być może hydroliza tych wiązań (oddzielenie łańcucha polisacharydowego od bocznych łańcuchów peptydowych) powoduje większą destabilizację PG w porównaniu do hydrolizy innych jego wiązań, a więc może być ewolucyjnie faworyzowana przez bakteriofagi w celu osiągnięcia szybszej lizy. Aktywność amidazy wykazują m.in. endolizyny fagów gronkowcowych, w tym endolizyna faga  $\phi 11$  czy endolizyna LysK faga K [4,42].

Endopeptydazy (inaczej endoproteazy), należące do trzeciej grupy hydrolaz peptydoglikanu, hydrolizują wiązania peptydowe między resztami aminokwasowymi peptydów rdzeniowych przyłączonych bezpośrednio do reszt kwasu N-acetylmuraminowego lub między peptydami tworzącymi mostki poprzeczne łączące te peptydy i w ten sposób sieciującymi strukturę peptydoglikanu [23]. Różne specyficzności endolizyn tej grupy odzwierciedlają zapew-

ne zróżnicowanie liczby i typu reszt aminokwasowych peptydów wchodzących w skład peptydoglikanu bakterii należących do określonych taksonów [62]. Aktywność peptydazową endolizyny w hydrolizie wiązania między resztą alaniny w pozycji 1 a resztą kwasu glutaminowego w pozycji 2, zakonserwowanego w peptydach przyłączonych bezpośrednio do reszt kwasu N-acetylmuraminowego u większości bakterii, stwierdzono jedynie u fagów *Listeria* [36]. Opisano natomiast kilka endolizyn o aktywności endoproteaz, przystosowanych do trawienia peptydoglikanu konkretnego rodzaju lub gatunku gospodarza. Na przykład endopeptydaza faga  $\phi 11$  infekującego *S. aureus*, którego peptydoglikan charakteryzuje się swoistym, pentaglicynowym mostkiem peptydowym, hydrolizuje wiązanie peptydowe między D-alaniną obecną w rdzeniu peptydoglikanu a glicyną mostka poprzecznego [42]. Endopeptydaza faga 30 infekującego *Streptococcus agalactiae*, którego peptydoglikan jest usieciowany za pomocą mostków składających się z dwóch reszt alaniny, hydrolizuje wiązania między resztą D-alaniny rdzenia peptydoglikanu a resztą L-alaniny mostka poprzecznego [52]. Podobną aktywność wykazuje endolizyna PlyPy kodowana przez profaga *S. pyogenes* [39].

Czwartą i ostatnią grupą enzymów litycznych są transglikozylazy. Zgodnie z definicją enzymy te nie są 'prawdziwymi' hydrolazami, ponieważ do katalizy rozpadu wiązań peptydoglikanu nie wymagają wody. Podobnie jak muramidazy trawią wiązania  $\beta$ -1-4-glikozydowe między resztami kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglukozaminy, ale mechanizm tej reakcji jest inny; produktem pośrednim jest N-acetylo-1,6-anhydro-muramyl, dzięki czemu energia przerwanej wiązania jest zachowana [35,44]. Destrukcyjna aktywność endolizyn o aktywności transglikozylaz jest mniejsza niż destrukcyjna aktywność muramidaz.

Spośród wszystkich zbadanych dotąd endolizyn większość, na podstawie badań aktywności lub homologii z endolizynami o znanej funkcji, przyporządkowano do amidaz i muramidaz [36].

Rozpad wiązań peptydoglikanu, wynikający z działania endolizyn, prowadzi do powstania porów w ścianie komórkowej, przez które wysokie wewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne (~3 atm) wypycha błonę cytoplazmatyczną, co ostatecznie skutkuje lizą hipotoniczną (osmotyczną) komórek bakteryjnych [11,24].

Chociaż endolizyny o pojedynczej domenie katalitycznej są zdolne do wywołania lizy, wiele z nich ma dwie krótkie domeny katalityczne (100-200 reszt aminokwasowych), o odmiennej aktywności enzymatycznej. Należą do nich m.in. lizyny fagów *Staphylococcus* (LysK i  $\phi$ 11) oraz *Streptococcus* (B30 i LambdaSa2), a także wiele endolizyn mikrobakteriofagów [44,51,52,53]. Endolizyna faga LambdaSa2, infekującego *Streptococcus agalactiae*, zawiera N-terminalną domenę endopeptydazy, która wydaje się odpowiedzialna za prawie całą aktywność hydrolityczną enzymu oraz niemal pozbawioną aktywności C-terminalną domenę N-acetyloglukozaminidazy [21]. Podwójną domenę katalityczną, endopeptydazy i amidazy ma również endolizyna faga gronkowcowego K (LysK). W jej przypadku aktywność endopeptydazy pełni główną rolę w lizie z zewnątrz, powodowanej przez zewnątrzkomórkowe działanie endolizyny fagowej na komórkę bakteryjną, przy niewielkiej w tym przypadku (jeśli nie żadnej) aktywności amidazy. Ta ostatnia natomiast może być niezbędna endolizynie do jej pierwotnej roli, a więc uwolnienia potomnych cząstek fagowych z komórki bakteryjnej. Możliwe również, że domena amidazowa do osiągnięcia maksymalnej aktywności wymaga produktów trawienia peptydoglikanu przez domenę o aktywności endopeptydazy bądź też innych kofaktorów powstałych podczas rozwoju litycznego faga [3]. Podobną kombinację, wysoce aktywnej N-terminalnej domeny peptydazowej i niemal bezfunkcyjnej domeny amidazowej, wykryto w przypadku endolizyny gronkowcowego faga  $\phi$ 11 [59]. To, że kombinacja ta powtarza się w białkach pozornie ze sobą niepowiązanych nasuwa pytanie o sens ewolucyjnego podtrzymywania nieaktywnej domeny. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem, wydają się nieznane dotąd różnice między lizą z zewnątrz (przy okazji której zidentyfikowano pozornie bezfunkcyjne domeny), a tą zachodzącą od wewnątrz komórki bakteryjnej w przebiegu rozwoju litycznego faga [44].

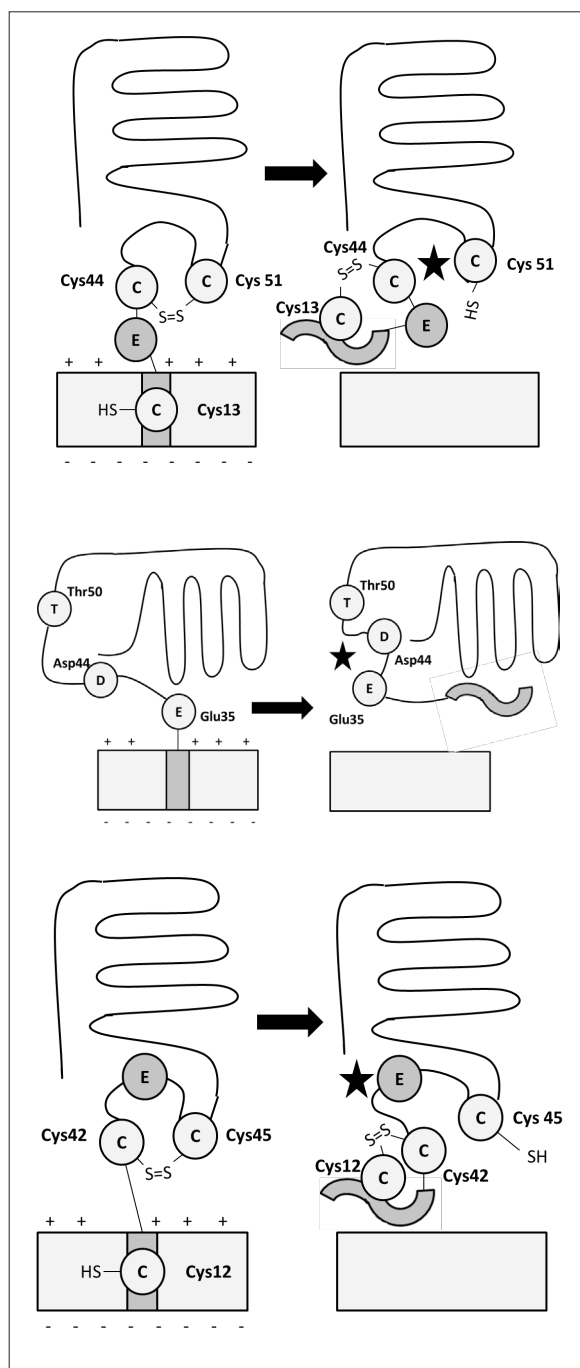
## Specyficzność endolizyn fagowych

W wyniku ewolucji endolizyny nabyły wysoką specyficzność substratową [36]. Oddziałują selektywnie z potencjalnym substratem, jakim jest warstwa peptydoglikanu ściany komórkowej danego gatunku czy rodzaju bakterii. Jak wcześniej wspomniano, to wysokie powinowactwo enzymu do substratu jest zwykle uwarunkowane obecnością domen wiążących ścianę komórkową (cell wall binding domain, CBD), typowo umiejscowionych na C-końcu białka. CBD rozpoznają i wiążą się do swoistych ligandów (zwykle węglowodanów lub kwasów tejchojowych) obecnych w bakteryjnej ścianie komórkowej, umożliwiając tym samym utworzenie kompleksu enzym-substrat [22,36,37]. Zdolność ta zapewnia endolizynom wysoką specyficzność względem rozpoznawanych gatunków, serowarów czy nawet szczepów bakterii [37,43]. W kilku przypadkach rozpoznawane przez CBD epitopy są analogiczne do rozpoznawanych przez włókienka fagowe receptorów powierzchniowych, jak np. w przypadku endolizyny Cp-1, wiążącej cholinę obecną w ścianie komórkowej pneumokoków [44]. W wielu jednak przypadkach specyficzność fagów względem ich gospodarzy jest węższa niż kodowanych przez nie endolizyn. Skrajnym przykładem jest endolizyna faga *Acinetobacter baumannii*,  $\phi$ AB2, zdolna do lizy zarówno Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych bakterii [34].

Ogólnie, porównanie między endolizynami należącymi do tej samej klasy enzymów wykazuje duże podobieństwo sekwencji aminokwasowych w N-końcowym katalitycznym regionie, a małe w C-końcowym regionie wiążącym substrat [24]. Wskazuje to na szczególnie dużą różnorodność domen wiążących ścianę komórkową (co wynika z wysokiej specyficzności domeny wiążącej względem ligandów wąskiego zakresu gospodarzy), w porównaniu do silnie zakonserwowanej domeny katalitycznej.

## Endolizyny zawierające sekwencję SAR

W większości przypadków endolizyny nie mają sekwencji sygnałowych, które pozwoliłyby na transport enzymu z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej, zapewniając mu tym samym dostęp do peptydoglikanu [24]. Klasyczne endolizyny wytwarzane jako w pełni aktywne enzymy są gromadzone w cytoplazmie. Oddzielone od peptydoglikanu błoną cytoplazmatyczną gospodarza nie mogą się przedostać do ściany komórkowej w nieobecności białek pomocniczych - holin [36]. Jednak wśród endolizyn, które są homologami endolizyny faga T4 i hydrolizują wiązanie glikozydowe między resztą kwasu N-acetylmuraminowego i N-acetyloglukozaminy jest wiele takich przykładów, które mają na N-końcu sekwencje sygnałowe i mogą się przedostawać przez błonę cytoplazmatyczną z udziałem bakteryjnego systemu sekrecyjnego - *sec* [13,33,72,75]. N-terminalna sekwencja sygnałowa SAR (signal-anchor-release) umożliwia uwolnienia do peryplazmy enzymu, początkowo zakotwiczonego z jej udziałem w błonie [33]. Zdolność ta wynika prawdopodobnie z dużej zawartości słabo hydrofobowych i polarnych reszt aminokwasowych, tj. Gly, Ala, Ser i Thr [71]. Ponieważ domena SAR nie jest odcinana przez peptydazę sygnałową, pierwotnie nieaktywny enzym pozostaje



Ryc. 4. Schemat proponowanych mechanizmów aktywacji endolizyn SAR różnych klas: a) endolizyny LyzP1 (klasa I); b) endolizyny R21 (klasa II); c) endolizyny Lyz103 (klasa III); gwiazdką zaznaczono rejon aktywowywany centrów katalitycznych poszczególnych endolizyn. Błone cytoplazmatyczną oznaczono szarym prostokątem

uwięziony w membranie, podczas gdy jego część katalityczna jest już obecna w peryplazmie. Dopiero spontaniczna lub zależna od holin depolaryzacja błony doprowadza do ostatecznego uwolnienia enzymu i przekształcenia go w aktywną, rozpuszczalną formę [33]. Ta funkcjonalna regulacja jest niezbędna do uniknięcia przedwczesnej lizy zakażonej komórki gospodarza [66].

Endolizyny można zatem podzielić na dwie podstawowe grupy, przyjmując jako kryterium podziału autonomiczność ich działania: endolizyny holinozależne, czyli te bez N-terminalnej sekwencji SAR oraz endolizyny tę sekwencję mające, potencjalnie niezależne od typowych holin [71]. W przeciwieństwie do typowych endolizyn, takich jak endolizyna R faga  $\lambda$  ( $R^\lambda$ ), endolizyny z sekwencją SAR są początkowo utrzymywane jako enzymatycznie nieaktywne białka zakotwiczone w membranie [71]. Różnice w budowie ich centrum katalitycznego oraz samej sekwencji SAR pociągają za sobą odmienne mechanizmy aktywacji, a więc uwolnienia ich do peryplazmy i zapoczątkowania procesu hydrolizy peptydoglikanu, prowadzące do lizy komórki gospodarza. Na tej podstawie wydzielono trzy klasy endolizyn z sekwencją SAR (ryc. 4).

#### Endolizyny SAR klasy I - na przykładzie Lyz<sup>P1</sup>

Pierwszą poznaną endolizyną klasy I jest białko Lyz faga P1, które zawiera resztę cysteiny w sekwencji SAR oraz w centralnej części triady katalitycznej (tworzą ją Glu42-Cys51-Thr57) [71]. Głównym elementem regulującym aktywność Lyz<sup>P1</sup> jest katalityczna reszta cysteinowa (Cys<sub>51</sub>) położona w centralnej pozycji tej triady [33]. Związana z błoną forma Lyz<sup>P1</sup> jest nieaktywna z dwóch przyczyn. Po pierwsze cała domena katalityczna jest źle sfałdowana, a miejsce aktywne enzymu zmienione; po drugie katalityczna reszta Cys<sub>51</sub> jest związana wiązaniem dwusiarczkowym z inną resztą cysteiny białka (Cys<sub>44</sub>), blokując w ten sposób działanie enzymu. Na podstawie tych informacji zaproponowano model aktywacji endolizyny Lyz<sup>P1</sup>, według którego reszta cysteinowa (Cys<sub>13</sub>) obecna w sekwencji SAR, uwolnionej uprzednio z błony, wywołuje izomeryzację wiązania dwusiarczkowego i wiążąc się z Cys<sub>44</sub> doprowadza do wyzwolenia katalitycznej reszty Cys<sub>51</sub> [33,66]. Ponadto cała domena katalityczna ulega reorganizacji konformacyjnej, co powoduje prawidłowe sfałdowanie miejsca aktywnego enzymu. Uwolniona sekwencja SAR pozostaje w bliskim kontakcie z resztą enzymu ze względu na wiązanie dwusiarczkowe łączące Cys<sub>13</sub> z uwolnioną resztą Cys<sub>44</sub>. Pozwala to na ciągłe utrzymanie enzymu w jego aktywnej formie [71]. Zgodnie z tym modelem sekwencja SAR białka Lyz<sup>P1</sup> spełnia dwie funkcje. Po pierwsze, pośredniczy w asocjacji endolizyny z błoną komórkową, działając jako sekwencja sygnałowa i domena transmembranowa. Po drugie, po uwolnieniu z błony, jej reszta cysteinowa doprowadza do izomeryzacji wiązań, niezbędnych do przyjęcia przez enzym aktywnej konformacji. Wydaje się więc, że Lyz<sup>P1</sup> ulega aktywacji przez zniesienie ograniczeń topologicznych, kowalencyjnych i konformacyjnych białka.

Typ regulacji charakterystyczny dla endolizyny faga P1 nie jest powszechny w przypadku większości endolizyn SAR. Mimo że 58 genomów fagowych koduje endolizynę z triadą katalityczną i większość z nich ma N-końcową sekwencję transmembranową SAR (43/58), to jedynie 9 z nich ma resztę cysteinową wewnątrz sekwencji SAR i dodatkowo cysteinę w triadzie katalitycznej enzymu. Aktywność pozostałych 34 endolizyn jest więc regulowana odmiennie [66].



### Endolizyny SAR klasy II – na przykładzie R<sup>21</sup>

Większość endolizyn z sekwencją SAR należy do drugiej klasy, reprezentowanej przez białko R<sup>21</sup>, pochodzące z lamdoidalnego faga 21. Enzymy te charakteryzuje kanoniczna triada katalityczna Glu-(X)<sub>8</sub>-Asp-(X)<sub>5</sub>-Thr z centralną resztą Asp i brak reszty cysteinowej w sekwencji SAR [33]. Podczas gdy endolizyna Lyz<sup>P1</sup> jest utrzymywana w nieaktywnej formie dzięki dwupoziomowej negatywnej regulacji – przez kowalencyjną inaktywację cysteiny w centrum aktywnym enzymu oraz nieprawidłowości konformacyjne N-końcowej domeny katalitycznej, endolizyna R<sup>21</sup> pozostaje nieaktywna jedynie dzięki niewłaściwemu umiejscowieniu reszty glutaminianu w centrum aktywnym enzymu [71]. Jej aktywność jest zablokowana przez sąsiedztwo z błoną komórkową, w której jest osadzona sekwencja SAR [33,66]. Sekwencja SAR po uwolnieniu z membrany zostaje włączona do hydrofobowego rdzenia enzymu, powodując konformacyjną przebudowę jego domeny C-końcowej. Zmiana ta umożliwia właściwe ułożenie reszty glutaminianu (Glu<sub>35</sub>), a w konsekwencji odtworzenie miejsca aktywnego enzymu [33]. Zgodnie z tym modelem nowo uwolniona sekwencja SAR aktywuje endolizynę R<sup>21</sup> przez przestrzenne wpasowanie się w strukturę C-końcowej domeny białka [66].

### Endolizyny SAR klasy III – na przykładzie Lyz<sup>103</sup>

Wyodrębnione wyżej modele aktywacji endolizyn SAR wzbogacono niedawno o trzeci, odrębny, wykorzystywany przez endolizynę faga ERA103 (Lyz<sup>103</sup>) infekującego *Erwinia amylovora*. Endolizyny klasy III wydają się łączyć cechy endolizyn klasy I i II. Endolizyna Lyz<sup>103</sup> faga ERA103 ma resztę cysteinową w hydrofobowej sekwencji SAR przy zachowaniu kanonicznej reszty Asp w triadzie katalitycznej [33]. N-końcowa domena katalityczna Lyz<sup>103</sup> zawiera dodatkowo dwie reszty cysteiny. W sumie obecność trzech reszt cysteiny, w tym jednej w sekwencji SAR, sugeruje możliwość występowania enzymu w dwóch formach izomerycznych różniących się organizacją wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych. Mimo że Lyz<sup>103</sup> nie zawiera cysteiny w triadzie katalitycznej, przypuszcza się, że jest ona aktywowana (podobnie jak Lyz<sup>P1</sup>) przez izomeryzację wiązań, wywołaną przez uwolnioną cysteinę obecną w sekwencji SAR (Cys<sub>12</sub>). W tym przypadku wiązanie dwusiarczkowe hamujące aktywność enzymu tworzy się między resztami cystein okalającymi katalityczną resztę glutaminianu [33].

Różnorodność strategii regulujących aktywność endolizyn z sekwencją SAR potwierdza jak ważna jest optymalizacja czasu lizy [71]. Montaż wirionów potomnych, poprzedzony ekspresją późnych genów litycznych faga, jest w tym przypadku etapem kulminacyjnym, a związany z tym wybór najbardziej optymalnego momentu lizy warunkiem koniecznym dla jej skuteczności [49,76]. Biologiczne znaczenie sekwencji SAR endolizyn nie jest do końca wyjaśnione, tym bardziej że bakteriofagi kodujące takie endolizyny kodują też holiny. Utrzymujące się na niskim poziomie, spontaniczne uwalnianie endolizyny SAR z membrany do peryplazmy doprowadza ostatecznie do lizy komórki bakteryjnej bez udziału klasycznych holin,

jednak dopiero depolaryzacja błony cytoplazmatycznej umożliwia szybkie zajście tego procesu [49,72].

### HOLINY

Holiny są jedną z najbardziej zróżnicowanych grup białek. Znanych jest ponad 150 genów kodujących holiny, ich produkty pogrupowano w obrębie 52 rodzin białek [27,55,70]. Prawie wszystkie holiny są małymi białkami, które akumulują się w błonie cytoplazmatycznej bez szkody dla komórki, podczas ekspresji późnych genów faga [20,27,70]. W ściśle zaprogramowanym czasie powodują powstawanie letalnych uszkodzeń lub „dziur” w membranie. Zapoczątkowuje to lizę bakterii, przez umożliwienie przejścia endolizynom niemającym sekwencji SAR z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej, w której znajduje się peptydoglikan, lub aktywację endolizyn z sekwencją SAR (ryc. 1) [20,32,56,70,75].

Mimo że sekwencje aminokwasowe holin są silnie zróżnicowane, większość charakteryzuje się wspólnymi cechami strukturalnymi: stosunkowo mały rozmiar (60-155 reszt aminokwasowych), obecność od jednej do trzech domen transmembranowych oddzielonych łącznikami międzydomenowymi, hydrofobowy N-końiec oraz polarny, dodatnio naładowany C-końiec białka [56]. Holiny nie są białkami specyficznymi w stosunku do endolizyn, a transport białek przez utworzone z udziałem holin „pory” ograniczony jedynie przez rozmiar porów [70].

Na podstawie pierwszorzędowej struktury białka, holiny są podzielone na trzy główne klasy [65,77].

Do klasy I zalicza się holiny o długości ponad 95 reszt aminokwasowych, zawierające trzy domeny transmembranowe. N-końiec białka znajduje się w peryplazmie, a C-końiec w cytoplazmie (np. holina S faga λ, Y faga P2).

Do klasy II włączono holiny o długości 50-90 reszt aminokwasowych, mające dwie domeny transmembranowe. Zarówno ich N-, jak i C-końiec znajdują się w cytoplazmie (np. holina S<sup>21</sup> faga S, gp17.5 faga T7).

W obrębie klasy III zgrupowano holiny o dużej zawartości reszt hydrofilowych, zawierające tylko jedną domenę transmembranową. Ich C-końiec znajduje się w peryplazmie, a N-końiec w cytoplazmie (np. holina T faga T4) [73].

Najlepiej poznaną holiną jest białko gpS105 składające się ze 105 reszt aminokwasowych i mające trzy domeny transmembranowe. Jest ono kodowane przez gen S bakteriofaga λ.

### ANTYHOLINY

Antyholiny to białka antagonistyczne w stosunku do holin [69,73]. Mogą być dodatkowym produktem genu holiny lub produktami osobnych genów [70]. Poznano co najmniej pięć odrębnych typów antyholin. Trzy z nich są reprezentowane przez białka błonowe. Dwa pozostałe to białka cytoplazmatyczne lub występujące w peryplazmie

[73,74]. Antyholiny regulują czas wystąpienia lizy komórki bakteryjnej [75]. W razie nieobecności tych białek liza następuje za wcześnie w rozwoju faga, a to uniemożliwia dokończenie procesów morfogenezy.

### „Motyw podwójnego startu”

Geny kodujące holiny często zawierają tzw. „motyw podwójnego startu”, dzięki czemu w wyniku ich ekspresji powstają dwa odmienne białka, różniące się obecnością kilku aminokwasów na N-końcu. Krótszy produkt pełni funkcję holiny, natomiast dłuższy - antyholiny. Wśród dodatkowych aminokwasów prawie zawsze występuje arginina lub lizyna. Ich dodatni ładunek, przez reorientację N-końca białka, w stosunku do holiny, ma dramatyczny wpływ na jego funkcję [2,17,56,63,65,70]. W przypadku białek bakteriofaga  $\lambda$  antyholiną jest białko S107, którego N-koniec, ze względu na dodatkowy dodatni ładunek, jest umiejscowiony w cytoplazmie, podczas gdy N-koniec holiny S105 znajduje się w peryplazmie [56].

### ZEGAR LITYCZNY

Aktywność holin w systemie holina-endolizyna jest niezbędna do wystąpienia procesu lizy komórki bakteryjnej [32,70]. Moment, w którym holiny umożliwiają endolizynom dostęp do peptydoglikanu jest zoptymalizowany w wyniku ewolucji. Mają na to wpływ warunki środowiska, kondycja komórki gospodarza, a także antyholiny lub same holiny akumulujące się w błonie cytoplazmatycznej [32,73].

Zaproponowano kilka możliwych mechanizmów regulacji czasu lizy w powiązaniu z mechanizmami działania holin i/ lub antyholin. Według jednej propozycji (tzw. model „death raft”) holiny akumulują się w błonie cytoplazmatycznej w postaci rozproszonych w niej równomiernie homodimerów, co nie zaburza funkcji błony. W chwili osiągnięcia pewnego stężenia holin w błonie (tzw. „krytycznej koncentracji”), białka te zaczynają agregować, grupować się w tzw. „tratwy”, charakteryzujące się ciasno upakowanymi domenami transmembranowymi. Utworzenie tratw z rozproszonych holin trwa krócej niż minutę. W miejscach powstania „tratw”, dzięki interakcjom między transmembranowymi domenami holin, dochodzi do wyparcia lipidów budujących błonę i otwarcia niewielkich kanałów wodnych. Powoduje to miejscową depolaryzację błony, zmianę konformacyjną w cząsteczkach holin i ich przegrupowanie w obrębie tratw [18,67,70]. W wyniku przegrupowania powstają większe otwory otoczone cząsteczkami holin, których hydrofilowa powierzchnia jest zorientowana w kierunku światła otworu, natomiast hydrofobowa w kierunku lipidów błony [20,70]. W jednej komórce bakteryjnej występuje kilka skupisk holin o zróżnicowanych rozmiarach. Dowodów na ich istnienie dostarczyły liczne badania [60,61,70]. Największe poznane „tratwy” składają się z 1000-3000 cząsteczek holin, a najmniejsze z 50; średnica powstałych „dziur” może przekraczać 300 nm.

W drugim modelu, zaproponowanym dla bakteriofaga  $\lambda$ , w regulacji czasu lizy uwzględniono aktywność antyholin.

W tym przypadku wystąpienie lizy zależy od stosunku stężenia holiny (S105) do antyholiny (S107) w błonie cytoplazmatycznej oraz od bezwzględnego stężenia homodimerów holiny. Proporcje syntezy obu tych białek są regulowane. W pobliżu 5'-końca mRNA genu *S* stwierdzono obecność drugorzędowej struktury mRNA nazwanej *sdi* (site-directed initiation). Pełni ona funkcję kontrolną, ściśle regulując częstość inicjacji translacji od kodonu metioninowego Met<sub>1</sub> w stosunku do częstości inicjacji od kodonu metioninowego Met<sub>3</sub> [28]. W komórkach *E. coli* typu dzikiego stosunek obu białek wynosi 2,5:1 [73]. Według proponowanego modelu holina S105 występuje w błonie w postaci heterodimerów z antyholiną (S107) lub w postaci homodimerów, ale heterodimery są tworzone preferencyjnie. Odmienność antyholiny od holiny, spowodowana występowaniem na jej N-końcu pozytywnie naładowanej reszty Lys<sub>2</sub> oraz reszty Met<sub>1</sub>, jest wystarczająca zarówno dla jej niezdolności do tworzenia „dziur” w błonie, jak i do blokowania tworzenia „dziur” przez heterodimery [69,73]. Zblokowanie części cząsteczek holiny przez tworzenie heterodimerów z antyholiną przeciwdziała tworzeniu porów, ale tylko do czasu osiągnięcia tzw. „krytycznej koncentracji” przez gromadzące się jednocześnie w komórce homodimery holiny. Dochodzi wtedy do powstania pierwszej „dziury”, co wywołuje częściową depolaryzację błony [70,73]. Zgodnie z tym modelem czas zapoczątkowania lizy w komórkach zainfekowanych fagiem  $\lambda$  jest odwrotnie proporcjonalny do nadmiaru holiny S105 względem antyholiny S107. Dochodzi do niej przy stężeniu S105 wynoszącym  $1-3 \times 10^3$  cząsteczek na komórkę [69].

Wytwarzanie antyholiny opóźnia nie tylko czas lizy, co umożliwia zakończenie procesu morfogenezy fagów, ale też zwiększa efektywność powstawania „dziur”. Wynika to z tego, że inhibicyjna aktywność antyholin ujawnia się jedynie w przypadku nienaruszonej polarności błony [28]. Natomiast w sytuacji zachwiania polarności następują konformacyjne zmiany w cząsteczce antyholiny, która jest przekształcana w aktywną holinę przez „przeskoczenie” N-końca białka z cytoplazmy do peryplazmy [56,69,77]. W takiej sytuacji pierwotne heterodimery są również zdolne do tworzenia „dziur” i dochodzi do całkowitej depolaryzacji błony [56,73].

Tworzenie dimerów białek *S* może być wynikiem powstania mostków dwusiarczkowych z udziałem reszty cysteinowej Cys<sub>51</sub> znajdującej się w drugiej domenie transmembranowej holiny. Badania wykazały jednak, że obecność tych wiązań nie jest niezbędna do pełnego funkcjonowania holiny. Większość holin tworzy dimery nie łącząc się ze sobą kowalencyjnie [28].

Otwory w błonie komórkowej bakterii tworzone przez holinę S105<sup>λ</sup> są bardzo duże jak na kanały błonowe. Osiągają rozmiary od 88 nm do 1,2  $\mu$ m, średnio ~340 nm [20,60]. Są wystarczająco duże, by umożliwić przejście całkowicie sfalowanej endolizynie, której rozmiar to 18 kDa w przypadku endolizyny faga  $\lambda$  i nawet ponad 70 kDa w przypadku endolizyn innych fagów [28]. Mają nieregularny kształt, nie są skupione w jakimś specyficznym miejscu membrany, ale są rozproszone przypadkowo. Stwierdzono w przybli-

zeniu obecność dwóch „dziur” na komórkę [20]. Zdolność do tworzenia mikronowych „dziur” podobnych do tworzonych przez holinę S105 faga  $\lambda$  przedstawiono niedawno również w przypadku holiny Y faga P2 i holiny T faga T4 [61]. W badaniach z wykorzystaniem komórek *E. coli* udowodniono, że siła protonomotoryczna błony komórkowej w czasie ekspresji genów litycznych nie ulega zmianie aż do kilku-kilkunastu sekund przed lizą bakterii (około 19 s w przypadku działania holiny S105<sup>λ</sup>) [27].

Oczyszczona holina S105 faga  $\lambda$  okazała się również zdolna do destabilizacji błony liposomów. Możliwość tworzenia liposomów o strukturze błony identycznej ze strukturą błony cytoplazmatycznej pozwala na odniesienie otrzymanych wyników do komórki bakteryjnej i badanie możliwości tworzenia „dziur” w błonie cytoplazmatycznej w razie obecności w komórce samej holiny S105 [65].

W przypadku fagów, których antyholicy nie zawierają domen transmembranowych zaproponowano alternatywny model działania systemu holina-antyholicina, w którym antyholicina zakłóca stabilność holiny lub transkryptu kodującego holicinę, przez co reguluje stężenie kompleksów mogących tworzyć „dziury” [64].

### Pinholiny

U fagów kodujących endolizyny SAR określone białka błonowe są wymagane jedynie do zaburzenia gradientu protonowego błony (PMF), dzięki czemu kontrolują czas lizy. Białka te zwane pinholinami, tworzą małe uszkodzenia w błonie, prowadząc do jej depolaryzacji, w odróżnieniu od dużych „dziur” wytworzonych przez typowe holiciny [49]. Przypuszcza się, że depolaryzacja zaburzająca jonowe interakcje między pozytywnie naładowanym regionem N-terminalnym endolizyny SAR a negatywnie naładowaną wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej może być wystarczającą zmianą, umożliwiającą uwolnienie endolizyny SAR do peryplazmy [13,49]. Najlepiej poznaną pinholiną jest białko S<sup>21</sup> lambdoidalnego faga 21 składające się z 68 reszt aminokwasowych; zawiera ono dwie domeny transmembranowe [10,45,46,49,50]. Zamiast kilkumikronowej wielkości „dziur” S<sup>21</sup> tworzy w błonie *E. coli* około 1000 heptamerycznych kanałów o średnicy zaledwie ~2 nm, zwanych z angielskiego

„pinholes”, co można by przetłumaczyć jako „dziurki” [47]. Tworzenie „dziurek” przez białko S<sup>21</sup> powoduje depolaryzację błony. Wystarcza to do gwałtownego uwolnienia do peryplazmy aktywnej formy endolizyny SAR faga 21. Nie jest natomiast wystarczające do pokonania bariery błony cytoplazmatycznej przez endolizyny pozbawione domeny SAR, co wskazuje, że rola pinholin ogranicza się do precyzyjnej regulacji czasu lizy i nie ma nic wspólnego z eksportem endolizyn przez błonę cytoplazmatyczną [49,75]. Wydaje się zatem, że jedyna analogia między rolą pinholin, a rolą holicin wraz z antyholicinami w procesie lizy dotyczy kontroli momentu rozpoczęcia lizy przez synchronizację czasu aktywacji zgromadzonych w komórce cząsteczek endolizyn.

### PODSUMOWANIE

Proces lizy zainfekowanej komórki bakterii związany z uwalnianiem namnożonych w niej bakteriofagów jest badany od wielu lat w warunkach laboratoryjnych. Mimo to wiele jego aspektów, szczególnie tych istotnych dla lizy komórek w naturze, wciąż czeka na wyjaśnienie. Chociaż kanoniczny model lizy, zakładający współdziałanie trawiącej ścianę komórkową endolizyny i zapewniającej endolizynie dostęp do peptydoglikanu ściany holiny, jest w wielu przypadkach aktualny, wyniki ostatnich badań wskazują, że nie jest ani uniwersalny ani wystarczający do wyjaśnienia wszystkich aspektów lizy. Wiele endolizyn nie wymaga holicin do transportu przez błonę, a zwane pinholinami białka powodujące depolaryzację błony są niezbędne jedynie do ich aktywacji. Rola w tym procesie antyholicin, negatywnych regulatorów lizy nie jest znana. Chociaż w przypadku bakterii Gram-ujemnych aktywność fagowej endolizyny i holiny wystarcza do lizy w warunkach wytrząsanych hodowli laboratoryjnych, naturalnie w lizie uczestniczą białka zwane spaninami. Są one niezbędne do szybkiej destrukcji błony zewnętrznej przez jej połączenie z błoną cytoplazmatyczną zaraz po zniszczeniu przez endolizynę dzielącej obie błony ściany komórkowej. Mimo że same endolizyny fagowe ze względu na specyficzność w trawieniu ściany komórkowej bakterii są postrzegane jako potencjalne narzędzie w walce z bakteryjnymi patogenami, poznanie warunków ich aktywacji i działania oraz funkcji białek wspomagających proces lizy, stwarza szansę skuteczniejszego wykorzystanie endolizyn jako środków przeciwbakteryjnych.

### PIŚMIENICTWO

[1] Baker J.R., Liu C., Dong S., Pritchard D.G.: Endopeptidase and glycosidase activities of the bacteriophage B30 lysin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006; 72: 6825-6828

[2] Barenboim M., Chang C.Y., dib Hajj F., Young R.: Characterization of the dual start motif of a class II holin gene. *Mol. Microbiol.*, 1999; 32: 715-727

[3] Becker S.C., Dong S., Baker J.R., Foster-Frey J., Pritchard D.G., Donovan D.M.: LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009; 294: 52-60

[4] Becker S.C., Foster-Frey J., Donovan D.M.: The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008; 287: 185-191

[5] Bernhardt T.G., Wang I.N., Struck D.K., Young R.: A protein antibiotic in the phage Q $\beta$  virion: diversity in lysis targets. *Science*, 2001; 292: 2326-2329

[6] Bernhardt T.G., Wang I.N., Struck D.K., Young R.: Breaking free: “protein antibiotics” and phage lysis. *Res. Microbiol.*, 2002; 153: 493-501

[7] Berry J., Rajaure M., Pang T., Young R.: The spanin complex is essential for lambda lysis. *J. Bacteriol.*, 2012; 194: 5667-5674

[8] Berry J.D., Rajaure M., Young R.: Spanin function requires subunit homodimerization through intermolecular disulfide bonds. *Mol. Microbiol.*, 2013; 88: 35-47

- [9] Berry J., Summer E.J., Struck D.K., Young R.: The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.*, 2008; 70: 341-351
- [10] Bonovich M.T., Young R.: Dual start motif in two lambdoid S genes unrelated to lambda S. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 2897-2905
- [11] Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 366-377
- [12] Briers Y., Lavigne R., Plessers P., Hertveldt K., Hanssens I., Engelborghs Y., Volckaert G.: Stability analysis of the bacteriophage phiKMV lysin gp36C and its putative role during infection. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 1899-1905
- [13] Briers Y., Peeters L.M., Volckaert G., Lavigne R.: The lysis cassette of bacteriophage phiKMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin. *Bacteriophage*, 2011; 1: 25-30
- [14] Briers Y., Schmelcher M., Loessner M.J., Hendrix J., Engelborghs Y., Volckaert G., Lavigne R.: The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2009; 383: 187-191
- [15] Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R.: Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages phiKZ and EL. *Mol. Microbiol.*, 2007; 65: 1334-1344
- [16] Caldentey J., Hänninen A.L., Bamford D.H.: Gene XV of bacteriophage PRD1 encodes a lytic enzyme with muramidase activity. *Eur. J. Biochem.*, 1994; 225: 341-346
- [17] Chang C.Y., Nam K., Young R.: S gene expression and the timing of lysis by bacteriophage lambda. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 3283-3294
- [18] Dennehy J.J., Wang I.N.: Factors influencing lysis time stochasticity in bacteriophage lambda. *BMC Microbiol.*, 2011; 11: 174
- [19] Desmarais S.M., De Pedro M.A., Cava F., Huang K.C.: Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol. Microbiol.*, 2013; 89: 1-13
- [20] Dewey J.S., Savva C.G., White R.L., Vitha S., Holzenburg A., Young R.: Micron-scale holes terminate the phage infection cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 2219-2223
- [21] Donovan D.M., Foster-Frey J.: LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008; 287: 22-33
- [22] Eugster M.R., Haug M.C., Huwiler S.G., Loessner M.J.: The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlnAc residues in cell wall teichoic acid. *Mol. Microbiol.*, 2011; 81: 1419-1432
- [23] Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A.: Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng. Bugs*, 2010; 1: 9-16
- [24] Fischetti V.A.: Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.*, 2005; 13: 491-496
- [25] Foley S., Bruttin A., Brüssow 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
- [26] Garcia P., Martin A.C., López R.: Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. *Microb. Drug Resist.*, 1997; 3: 165-176
- [27] Gründling A., Manson M.D., Young R.: Holins kill without warning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 9348-9352
- [28] Gründling A., Smith D.L., Bläsi U., Young R.: Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage lambda. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 6075-6081
- [29] Guttman B., Raya P., Kutter E.: Basic phage biology. W: Bacteriophages: biology and application, red.: E.B. Kutter, A. Sulakvelidze, CRC Press, Boca Raton (FL), 2005; 29-66
- [30] Hermoso J.A., Garcia J.L., Garcia P.: Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007; 10: 461-472
- [31] Jacob F., Fuerst C.R.: The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1958; 18: 518-526
- [32] Krupović M., Bamford D.H.: Holin of bacteriophage lambda: structural insights into a membrane lesion. *Mol. Microbiol.*, 2008; 69: 781-783
- [33] Kuty G.F., Xu M., Struck D.K., Summer E.J., Young R.: Regulation of a phage endolysin by disulfide caging. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 5682-5687
- [34] Lai M.J., Lin N.T., Hu A., Soo P.C., Chen L.K., Chen L.H., Chang K.C.: Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage phiAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011; 90: 529-539
- [35] Lehnher H., Hansen A.M., Ilyina T.: Penetration of the bacterial cell wall: a family of lytic transglycosylases in bacteriophages and conjugative plasmids. *Mol. Microbiol.*, 1998; 30: 454-457
- [36] Loessner M.J.: Bacteriophage endolysins - current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005; 8: 480-487
- [37] Loessner M.J., Kramer K., Ebel F., Scherer S.: C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.*, 2002; 44: 335-349
- [38] Loessner M.J., 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. Microbiol.*, 1995; 16: 1231-1241
- [39] Lood R., Raz A., Molina H., Euler C.W., Fischetti V.A.: A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014; 58: 3073-3084
- [40] Łobocka M.B., Rose D.J., Plunkett G.3<sup>rd</sup>, Rusin M., Samojedny A., Lehnher H., Yarmolinsky M.B., Blattner F.R.: Genome of bacteriophage P1. *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 7032-7068
- [41] Mosig G., Lin G.W., Franklin J., Fan W.H.: Functional relationships and structural determinants of two bacteriophage T4 lysozymes: a soluble (gene e) and a baseplate-associated (gene 5) protein. *New Biol.*, 1989; 1: 171-179
- [42] Navarre W.W., Ton-That H., Faull K.F., Schneewind O.: 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
- [43] Nelson D., Schuch R., Chahales P., Zhu S., Fischetti V.A.: PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 10765-10770
- [44] Nelson D.C., Schmelcher M., Rodriguez-Rubio L., Klumpp J., Pritchard D.G., Dong S., Donovan D.M.: Endolysins as antimicrobials. *Adv. Virus Res.*, 2012; 83: 299-365
- [45] Pang T., Park T., Young R.: Mapping the pinhole formation pathway of S21. *Mol. Microbiol.*, 2010; 78: 710-719
- [46] Pang T., Park T., Young R.: Mutational analysis of the S21 pinholin. *Mol. Microbiol.*, 2010; 76: 68-77
- [47] Pang T., Savva C.G., Fleming K.G., Struck D.K., Young R.: Structure of the lethal phage pinhole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 18966-18971
- [48] Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C.Q.: Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 104: 1-13
- [49] Park T., Struck D.K., Dankenbring C.A., Young R.: The pinholin of lambdoid phage 21: control of lysis by membrane depolarization. *J. Bacteriol.*, 2007; 189: 9135-9139

- [50] Park T., Struck D.K., Deaton J.F., Young R.: Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 19713-19718
- [51] Payne K.M., Hatfull G.F.: Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities. *PLoS One*, 2012; 7: e34052
- [52] Pritchard D.G., Dong S., Baker J.R., Engler J.A.: The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. *Microbiology*, 2004; 150: 2079-2087
- [53] Pritchard D.G., Dong S., Kirk M.C., Cartee R.T., Baker J.R.: LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 7150-7154
- [54] Rashed M., Uchiyama J., Takemura I., Hoshiba H., Ujihara T., Takatsuji H., Honke K., Matsuzaki S.: Tail-associated structural protein gp61 of *Staphylococcus aureus* phage  $\phi$ MR11 has bifunctional lytic activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008; 284: 9-16
- [55] Reddy B.L., Saier M.H.Jr.: Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013; 1828: 2654-2671
- [56] Rice K.C., Bayles K.W.: Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2008; 72: 85-109
- [57] Rydman P.S., Bamford D.H.: Identification and mutational analysis of bacteriophage PRD1 holin protein P35. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 3795-3803
- [58] Sao-Jose C., Nasrimento J.G., Parreira R., Santos M.A.: Release of progeny phages from infected cells. W: *Bacteriophage Genetics and Molecular Biology*, Mc Grath S., van Sinderen D. (red.), Caister Academic Press, Norfolk, UK., 2007; 307-334
- [59] Sass P., Bierbaum G.: Lytic activity of recombinant bacteriophage  $\phi$ 11 and  $\phi$ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 347-352
- [60] Savva C.G., Dewey J.S., Deaton J., White R.L., Struck D.K., Holzenburg A., Young R.: The holin of bacteriophage lambda forms rings with large diameter. *Mol. Microbiol.*, 2008; 69: 784-793
- [61] Savva C.G., Dewey J.S., Moussa S.H., To K.H., Holzenburg A., Young R.: Stable micron-scale holes are a general feature of canonical holins. *Mol. Microbiol.*, 2014; 91: 57-65
- [62] Schleifer K.H., Kandler O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, 1972; 36: 407-477
- [63] Schmidt C., Velleman M., Arber W.: Three functions of bacteriophage P1 involved in cell lysis. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 1099-1104
- [64] Silhavy T.J., Kahne D., Walker S.: The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2010; 2: a000414
- [65] Smith D.L., Struck D.K., Scholtz J.M., Young R.: Purification and biochemical characterization of the lambda holin. *J. Bacteriol.*, 1998; 180: 2531-2540
- [66] Sun Q., Kutay G.F., Arockiasamy A., Xu M., Young R., Sacchettini J.C.: Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 1192-1194
- [67] Wang I.N., Deaton J., Young R.: Sizing the holin lesion with an endolysin- $\beta$ -galactosidase fusion. *J. Bacteriol.*, 2003; 185: 779-787
- [68] Wang I.N., Dykhuizen D.E., Slobodkin L.B.: The evolution of phage lysis timing. *Evol. Ecol.*, 1996; 10: 545-558
- [69] Wang I.N., Smith D.L., Young R.: Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000; 54: 799-825
- [70] White R., Chiba S., Pang T., Dewey J.S., Savva C.G., Holzenburg A., Pogliano K., Young R.: Holin triggering in real time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 798-803
- [71] Xu M., Arulandu A., Struck D.K., Swanson S., Sacchettini J.C., Young R.: Disulfide isomerization after membrane release of its SAR domain activates P1 lysozyme. *Science*, 2005; 307: 113-117
- [72] Xu M., Struck D.K., Deaton J., Wang I.N., Young R.: A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 6415-6420
- [73] Young R.: Bacteriophage holins: deadly diversity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2002; 4: 21-36
- [74] Young R.: Phage lysis. W: *Phages. Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*, red.: Waldor K.M., Friedman D.I., Adhya S.A., ASM Press, Washington D.C., 2005; 92-128
- [75] Young R.: Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J. Microbiol.*, 2014; 52: 243-258
- [76] Young R., Wang I.N.: Phage lysis, W: *The Bacteriophages*, red.: R. Calendar and S.T. Abedon, Oxford University Press, Oxford, 2006; 104-126
- [77] Young R., Wang I.N., Roof W.D.: Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.*, 2000; 8: 120-128
- [78] Zheng Y., Struck D.K., Young R.: Purification and functional characterization of  $\phi$ X174 lysis protein E. *Biochemistry*, 2009; 48: 4999-5006

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.