

КОМПЛЕКСНОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

А. А. Загоскин¹, Р. А. Авакова¹, Л. Ф. Резвых¹, М. В. Захарова², Э. К. Мубаракшина¹, Р. А. Иванов¹, М. О. Нагорных^{1,2}✉

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, Россия

Широкое использование антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве значительно ускорило темпы возникновения бактерий со множественной устойчивостью к антибиотикам. Поскольку к традиционным антибиотикам довольно быстро возникает резистентность, одним из перспективных направлений является разработка альтернативных антимикробных препаратов, обладающих иными механизмами действия на бактерии. Ферменты с бактерицидным действием могут быть одним из вариантов таких антибактериальных средств. Целью работы было получить комбинированные препараты рекомбинантных белков, активных в отношении бактерий и их биопленок. С помощью подходов генной инженерии были получены растворимые формы пяти рекомбинантных белков. Два из них обладают бактериолитическим эффектом (эндолизины LysK и PM9 из бактериофагов *Staphylococcus aureus*), остальные способны разрушать внеклеточный ДНК-матрикс у биопленок (две неспецифические нуклеазы NucA, а также ДНК-специфичная дезоксирибонуклеаза I). Показано, что природный эндолизин PM9 с усеченным каталитическим доменом обладает меньшей в 4 раза бактериолитической эффективностью по сравнению с полноразмерным вариантом LysK. С помощью сравнительного анализа выявлена в 1,5–2 раза большая эффективность неспецифических нуклеаз для разрушения бактериальных биопленок по сравнению с ДНК-специфичной дезоксирибонуклеазой I. Продемонстрировано, что одновременное использование эндолизина и нуклеаз оказывает синергичное антибактериальное действие и разрушает биопленки патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*. Полученные результаты показывают перспективность разработки антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков.

Ключевые слова: эндолизин, нуклеаза, биопленки, *Staphylococcus aureus*

Финансирование: работа выполнена при поддержке программы Министерства высшего образования и науки РФ (соглашение №. 075-10-2021-113, уникальный номер проекта RF----193021X0001).

Вклад авторов: А. А. Загоскин, Р. А. Мирзоян — создание генетических конструкций, хроматографическая очистка рекомбинантных белков; Л. Ф. Резвых — создание генетических конструкций; М. В. Захарова, Э. К. Мубаракшина — подбор условий наработки рекомбинантных белков, эксперименты по наработке в разных штаммах *E. coli*; М. О. Нагорных — концепция работы, дизайн генетических конструкций, написание статьи; Р. А. Иванов — общее руководство.

✉ **Для корреспонденции:** Максим Олегович Нагорных
Проспект Науки, д. 5, г. Пущино, 142290, Россия; derbanner@gmail.com

Статья получена: 25.11.2024 **Статья принята к печати:** 15.12.2024 **Опубликована онлайн:** 23.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.064

COMPLEX ANTIBACTERIAL ACTION OF ENZYMES ACTING ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS

Zagoskin AA¹, Avakova RA¹, Rezvykh LF¹, Zakharova MV², Mubarakshina EK¹, Ivanov RA¹, Nagornykh MO^{1,2}✉

¹ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

The widespread use of antibiotics in medicine and agriculture has significantly accelerated the emergence rate of bacterial infections showing multiple antibiotic resistance. Since resistance to conventional antibiotics is developed rather quickly, designing alternative antimicrobial drugs with other mechanisms underlying their effects on bacteria is a promising. The enzymes possessing bactericidal activity may be one option for such antibacterial agents. The study aimed to produce the combination recombinant protein-based products active against bacteria and their biofilms. Soluble forms of five recombinant proteins were produced using the genetic engineering approaches. Two of these have a bacteriolytic effect (endolysins LysK and PM9 from the *Staphylococcus aureus* bacteriophages), the other are capable of disrupting extracellular DNA matrix in biofilms (two nonspecific nucleases NucA, as well as the DNA-specific deoxyribonuclease I). It has been shown that natural endolysin PM9 with the truncated catalytic domain shows 4 times lower bacteriolytic efficacy compared to the full-size LysK version. Comparative analysis revealed 1.5–2 times higher efficacy of nonspecific nucleases in terms of bacterial biofilm disruption compared to the DNA-specific deoxyribonuclease I. It has been shown that simultaneous use of endolysins and nucleases has a synergistic antibacterial effect and disrupts biofilms of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*. The findings show the prospects of developing the recombinant protein-based antibacterial drugs.

Keywords: endolysin, nuclease, biofilms, *Staphylococcus aureus*

Funding: the study was supported by the program of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-10-2021-113, unique project ID: RF----193021X0001).

Author contribution: Zagoskin AA, Mirzoyan RA — creating genetic constructs, chromatographic purification of recombinant proteins; Rezvykh LF — creating genetic constructs; Zakharova MV, Mubarakshina EK — selection of condition for recombinant protein production, experiments on production involving various *E. coli* strains; Nagornykh MO — study concept, genetic construct design, manuscript writing; Ivanov RA — general management.

DOI: 10.24075/brsmu.2024.064

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim O. Nagornykh
Prospekt Nauki, 5, Pushchino, 142290, Russia; derbanner@gmail.com

Received: 25.11.2024 **Accepted:** 15.12.2024 **Published online:** 23.12.2024

Резистентность патогенных бактерий к лекарственным препаратам стремительно растет, превращаясь в глобальную проблему мировой системы здравоохранения. По последним данным Всемирной организации здравоохранения, количество антимикробных лекарственных средств на

разных этапах разработки возросло с 80 (2021 г.) до 97 (2023 г.), тем не менее возникает вопрос о создании новых, инновационных средств для лечения инфекционных заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами, которые могли бы дополнить существующие

антибиотики, теряющие свою эффективность в результате широкого применения [1].

Одним из таких вариантов могут стать препараты на основе ферментов, обладающих антибактериальным действием. На сегодняшний день широко известны бактериолитические ферменты бактериофагов (эндолизины), которые вызывают лизис патогенных бактерий и могут быть использованы как терапевтические молекулы [2]. Эндолизины — это ферменты, которые кодируют в своих геномах бактериофаги и используют их для лизиса бактериальной клетки во время вирусной инфекции. Поскольку бактериофаги есть у всех бактерий и их разнообразие велико, их эндолизины являются очень перспективным классом бактериолитических ферментов. В настоящее время существует большое количество научных исследований и разработок антибактериальных препаратов на основе этих ферментов на доклинических и клинических стадиях испытаний [3]. Эндолизины как терапевтические вещества часто обладают более широким спектром специфичности, чем фаги, и их специфичность обычно проявляется на уровне рода или вида. Избирательность эндолизинов в отношении бактериальных мишеней обусловлена их доменами, связывающими клеточную стенку, которые обнаруживают и связывают рецепторы независимо от конкретного субстрата в клеточной стенке мишени. Так, за специфичное узнавание и связывание отвечает CBD-домен (cell wall binding domain), расположенный обычно на С-конце молекулы эндолизина. По этой причине граммотрицательные лизины имеют более широкий спектр мишеней, в то время как грамположительные часто имеют узкий спектр хозяев [4]. За каталитическую активность отвечает каталитический CD-домен (catalytic domain), а также его активность может быть усилена присутствием амидазного домена [5]. Еще одним преимуществом бактериолитических ферментов перед традиционными антибиотиками является отсутствие возникновения резистентности у бактерий, а также возможность воздействия на разные химические связи внутри клеточной стенки. Однако эндолизины не могут эффективно разрушать устойчивые биопленки, которые образуют многие патогенные бактерии, что является одной из существенных проблем современной антибактериальной терапии. Биопленки являются сложной надклеточной структурой, которая стабилизируется многими связями между органическими молекулами [6]. Ферменты, разрушающие биопленки, также являются перспективным классом антибактериальных средств и различаются по типам ферментативной активности, в зависимости от того, на какой компонент биопленки они воздействуют [7]. В том числе для многих бактериальных биопленок характерен матрикс из внеклеточной ДНК, который могут разрушать нуклеазы. Ранее было показано, что дезоксирибонуклеаза I обладает такой активностью [8]. В связи с этим актуальны поиск и характеристика новых нуклеаз с антибактериальным действием. Применение бактериолитических ферментов и их комбинаций с ферментами, оказывающими разрушающее действие на биопленки, может позволить увеличить эффективность терапии бактериальных инфекций. Такой суммарный эффект был показан, например, для антибактериального действия против *Mycobacterium tuberculosis* [9]. Ферменты, разрушающие связи внутри биопленок, могут стать одним из компонентов комплексного антибактериального препарата вместе с эндолизинами, оказывая синергическое антибактериальное действие.

Поэтому разработка подобных комбинированных антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих разной каталитической активностью, является перспективным направлением. Эффективность таких препаратов наиболее высока против грамположительных бактерий, в частности метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), борьба с которым в клинике является одной из приоритетных задач [10].

Цель этой работы — провести сравнительный анализ антибактериального действия нескольких комбинаций ферментов, обладающих бактериолитическим действием либо активностью в отношении бактериальных биопленок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование плазмид

Все плазмиды, используемые в этой работе, были получены с использованием рестриктазно-лигазного метода клонирования ДНК. Последовательности ДНК генов эндолизинов и ДНК-нуклеаз были синтезированы *de novo* с проведением кодон-оптимизации нуклеотидных последовательностей для *E. coli* (IDT, <https://www.idtdna.com/>). Нуклеотидные последовательности были взяты из баз данных PhaLP (www.phalp.org) и Uniprot (www.uniprot.org). Амплификацию всех последовательностей ДНК проводили с использованием высокоточной полимеразы Pfu (Takara, США), согласно протоколу производителя. Клонирование целевых генов проводили в вектор pET21a (Novagen, Англия), а также в набор векторов со вспомогательными полипептидами [11] на основе pET28a (Novagen, Англия) по сайтам рестрикции NdeI и NotI в ферментативной реакции с двумя соответствующими эндонуклеазами рестрикции («Сибэнзим», Россия) в течение 1 ч при 37 °С. Очистку ДНК фрагментов осуществляли после электрофореза из агарозного геля, с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Далее очищенные фрагменты ДНК смешивали и использовали в реакции лигирования с ферментом T4 ДНК лигазой (NEB, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего трансформировали компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen, Англия) при помощи электропорации (Bio-Rad, США) по протоколу производителя прибора. Из клонов, содержащих корректные вставки, выделяли плазмидную ДНК и подтверждали корректность в реакции секвенирования по методу Сэнгера.

Наработка рекомбинантных белков в *E. coli*

Наработку белков проводили в следующих штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков: *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Англия), *E. coli* Rosetta gami 2 (Novagen, Англия), *E. coli* SHuffle T7express (NEB, США). Так, плазмидами, содержащими гены нуклеаз или эндолизинов, трансформировали выбранный штамм при помощи термического шока и засеивали трансформационной смесью (100 мкл) жидкую среду LB в пробирках (3–5 мл) с селективными антибиотиками. Инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее пересевали выросшую культуру в соотношении 1 : 200 в колбы, содержащие требуемое количество культуральной среды LB (100–500 мл) с селективными антибиотиками. Наравали клеточную культуру до оптической плотности $OD_{600} = 0,5–0,6$ на шейкере при 180 об./мин на 37 °С. После достижения нужной оптической плотности

охлаждали культуру на льду 10 мин, добавляли индуктор до конечной концентрации 1 мМ ИПТГ, инкубировали при разных температурах (18 °С и 37 °С) и перемешивании 180 об./мин в течение 18 ч (18 °С) либо 6 ч (37 °С). Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4000 g и 4 °С.

Для оценки степени растворимости полученного белка осажденные клетки переводили в буфер А для разрушения (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonica Q700 (Qsonica, США) до просветления клеточной суспензии на льду (импульсы УЗ 3 с, охлаждение 6 с, 40 циклов). Осаждали разрушенные клетки при помощи центрифугирования (17 000 g) в течение 20 мин при 4 °С. Далее отбирали пробы супернатанта, содержащего растворимую форму целевого белка, а осадок, содержащий агрегированную форму, растворяли в 2М мочеvine для дальнейшего электрофоретического анализа. Разделение белков проводили при помощи электрофореза в ПААГ (10%) в денатурирующих условиях по стандартным методикам. После окраски в One-Step Blue® (Biotium, США) и отмывки от красителя гели фотографировали и проводили количественную оценку распределения белков между растворимой и нерастворимой формами. Денситометрический анализ гелей проводили с помощью приложения Image Lab (Bio-Rad, США).

Очистка белков с использованием аффинной хроматографии

Надосадочную жидкость после ультразвукового разрушения биомассы и центрифугирования клеточного дроба фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Таким образом получали препарат для хроматографической очистки, содержащий растворимую фракцию белков в буфере А (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) для нанесения на хроматографический сорбент IMAC (Bio-Rad® Nuviatm IMAC Resin, США). Белок элюировали хроматографическим буфером В (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,5 М имидазола). При необходимости препарат, полученный после очистки с использованием IMAC, концентрировали с использованием центрифужного концентратора Vivaspin® 500 (Sartorius, Германия) (размером пор 3,5 кДа) в 30–50 раз. При необходимости, далее препарат очищенного белка обрабатывали ТЕV-протеазой согласно рекомендациям производителя, в течение ночи при 4 °С, а далее проводили повторную хроматографическую очистку, но собирали уже фракцию, не связанную с сорбентом, которая содержала очищенный эндолизин. Полученный препарат сразу использовали для оценки противобактериальной активности.

Проверка антибактериальной активности полученных белковых препаратов против *Staphylococcus aureus*

Колонию *Staphylococcus aureus* скалывали и помещали в 3–5 мл жидкой среды LB и инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее 1 мл ночной культуры переносили в пробирку, центрифугировали в течение 3 мин при 4000 g, клеточный отсадок ресуспендировали в PBS, повторяли процедуру 3 раза. Отмытые клетки разводили в PBS до 0,1 при OD₆₀₀, 100 мкл разведенных клеток помещали в 96 луночный планшет и к ним добавляли 100 мкл исследуемого белка,

либо 100 мкл PBS в положительном контроле. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном помешивании 200 об./мин. После инкубирования клетки разводили в 100 раз в PBS, после чего 100 мкл полученной смеси высевали на агаризованные чашки без антибиотика. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С. На следующий день проводили подсчет колоний на чашках с контролем и исследуемыми белками, расчет антибактериальной активности проводили по следующей формуле:

$$X = 100 - ((\text{КОЕ образца} \times 100) / \text{КОЕ контроля}),$$

где X — антибактериальная активность исследуемого белка, выраженная в %; КОЕ образца — количество колониеобразующих единиц на чашке после инкубирования клеток с исследуемым белком; КОЕ контроля — количество колониеобразующих единиц на чашке без обработки исследуемым белком.

Для оценки антибиопленочной активности исследуемых белков колонию *S. aureus* помещали в 3–5 мл жидкой среды TBS (без глюкозы) и инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее ночную культуру разводили в TBS с добавлением 1% глюкозы до значения 0,08 при OD₆₀₀, после чего помещали по 200 мкл клеточной суспензии в 96 луночный планшет и инкубировали при 37 °С без перемешивания в течение 48 ч. После инкубирования трижды промывали полученные биопленки PBS, используя пипетирование. Таким образом избавлялись от планктонных клеток. Далее к биопленкам добавляли по 200 мкл исследуемых ферментов и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С без перемешивания. После инкубирования трижды отмывали лунки PBS, используя пипетирование и просушивали в течение 5 мин при комнатной температуре. Для окрашивания оставшихся биопленок добавляли по 200 мкл 0,1%-го раствора кристаллического фиолетового и инкубировали в течении 15 мин при комнатной температуре. После окрашивания клетки снова трижды отмывали PBS, используя пипетирование, и просушивали в течение 45 мин. Далее добавляли по 200 мкл 33% уксусной кислоты, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Анализ проводили с использованием прибора Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific, США), измеряя оптическую плотность при OD₆₀₀. Эффективность разрушения биопленок рассчитывали относительно контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение комбинированных антибактериальных препаратов на основе ферментов — перспективный способ совместить разные ферментативные активности против бактериальных патогенов в одном лекарственном средстве. Это позволяет не только увеличить эффективность антимикробного действия, в том числе против биопленок, но и снизить дозу препарата. Для получения отдельных компонентов такого препарата необходимо получить гомогенные белковые препараты для каждого фермента. В нашей работе мы получили отдельные препараты рекомбинантных белков, а далее тестировали их антибактериальную активность против отдельных клеток и биопленок *Staphylococcus aureus*. Общая экспериментальная схема исследования представлена на рис. 1. Первым этапом работы было получение генетических конструкций, кодирующих следующие белки: 1) эндолизин LysK стафилококкового фага K; 2) ранее неаннотированный эндолизин PM9_074 стафилококкового фага PM9 с усеченным каталитическим

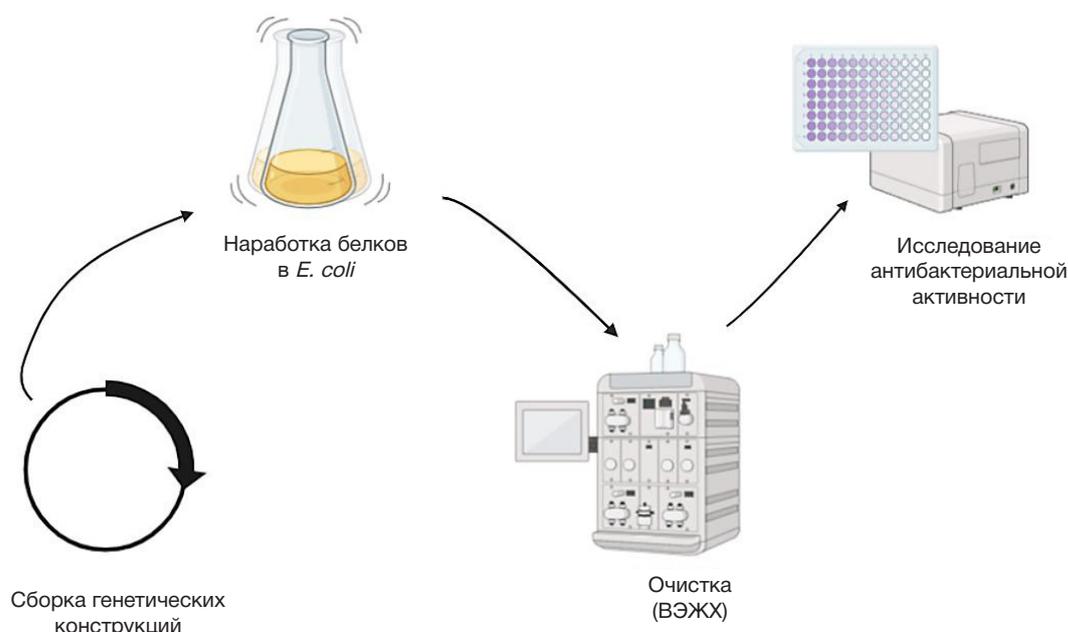


Рис. 1. Схема экспериментальной работы по получению препаратов энзибиотиков и проверке их антибактериальной активности

доном; 3) дезоксирибонуклеаза I человека (ДНКаза I); 4) неспецифическая нуклеаза NucA1 из *Serratia marcescens*; 5) неспецифическая нуклеаза NucA2 из *Anabaena sp.*

Все нуклеотидные последовательности были оптимизированы по кодоновому составу для экспрессии в *Escherichia coli* и кодировали в своем составе гистидиновый таг на N-конце для последующей аффинной хроматографической очистки. После синтеза генов *de novo* они были клонированы в плазмидный вектор pET21a для последующей экспрессии генов, кодирующих целевые рекомбинантные белки. Полученными генетическими конструкциями были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3), который предназначен для наработки рекомбинантных белков. После индукции и инкубации проводили оценку степени наработки целевых белков в

растворимой и нерастворимой форме. Нарработка белков при 37 °C и при 20 °C не дала хороших результатов, поскольку все целевые ферменты образовывали нерастворимые агрегаты (тельца включения). Замена штамма на два альтернативных *E. coli Rosetta gami 2*, *E. coli SHuffle T7express* не дала какого-либо положительного результата (табл. 1).

Поэтому далее для получения растворимых форм белков было решено проводить наработку со вспомогательными полипептидами, потенциально увеличивающими растворимость белков и их корректное сворачивание в пространстве [12]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие выбранные эндолизины и нуклеазы, были клонированы в ряд сконструированных нами ранее векторов, содержащих различные вспомогательные

Таблица 1. Оценка наработок рекомбинантных эндолизин и нуклеаз в штаммах *E. coli*

Температурный режим биосинтеза белка	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>Escherichia coli</i> Rosetta gami 2	<i>Escherichia coli</i> SHuffle T7express
pET21-LysK			
37 °C (6 ч)	H	H	H
18 °C (16–18 ч)	H	H	P+
pET21-PM9			
37 °C (6 ч)	H	H	H
18 °C (16–18 ч)	H	P+	P+
pET21-DnaseI			
37 °C (6 ч)	H	H	H
18 °C (16–18 ч)	H	H	H
pET21-NucA1			
37 °C (6 ч)	H	H	H
18 °C (16–18 ч)	H	H	H
pET21-NucA2			
37 °C (6 ч)	H	H	H
18 °C (16–18 ч)	H	H	P+

Примечание: P — растворимый, H — нерастворимый, «+» — степень наработки растворимого белка.

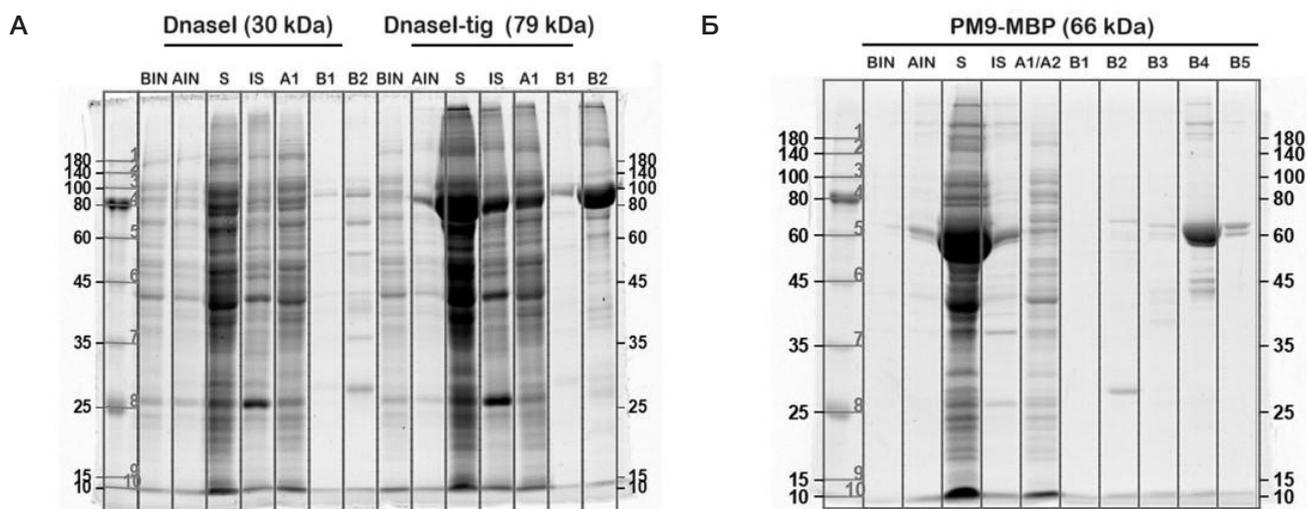


Рис. 2. Стратегия получения рекомбинантных белков, склонных к агрегации при помощи наработки в виде химерной молекулы, на N-конце которой находится вспомогательный полипептид, повышающий растворимость целевого белка. В частности, электрофореграмма в ПААГ демонстрирует примеры влияния вспомогательного полипептида TIG на растворимость ДНКазы I (А) и вспомогательного полипептида MBP на растворимость эндолизина PM9 (Б)

полипептиды. Мы уже использовали такой подход на практике для получения гомогенного препарата ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме [13]. Система представляет собой набор плазмид, каждая из которых содержит определенный хелперный полипептид и сайт расщепления TEV-протеазы на N-конце нуклеотидной последовательности целевого гена. В результате наработки химерного белка с использованием такого вектора повышается вероятность получения растворимого белкового препарата. В системе использованы следующие вспомогательные полипептиды: MBP, GST, TIG, YrhB, PpiB, TRX, TSF, SUMO, FH8. Проверку наработки рекомбинантных белков с использованием этого набора плазмид проводили также в штамме *E. coli* BL(DE3) при двух температурных режимах, как было описано ранее. Продукция белка при 37 °С независимо от присутствия партнерского полипептида происходила в основном с образованием нерастворимых агрегатов, в отличие от продукции белка при 18 °С, где отдельные вспомогательные полипептиды

существенно повысили выход растворимой формы целевых белков (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, получили наиболее продуктивные комбинации «вспомогательный полипептид-целевой белок» и удалось подобрать подходящие условия наработки, которые помогли получить целевые белки в растворимой форме. Наиболее высокие выходы эндолизинов и нуклеаз удалось получить при использовании вспомогательных полипептидов MBP и TIG (табл. 2).

Далее была изучена антибактериальная активность полученных ферментов, а также их способность разрушать бактериальные биопленки *Staphylococcus aureus* как в виде монопрепаратов, так и в виде комбинаций ферментативных активностей. Сперва мы сравнили активность двух эндолизинов в отношении бактериальных клеток (рис. 3). Идентичный узнающий домен обоих эндолизинов позволяет сравнивать каталитические активности этих молекул в прямом эксперименте. Результаты демонстрируют, что оба фермента проявляют

Таблица 2. Оценка наработок рекомбинантных эндолизинов и нуклеаз в штаммах *E. coli*

Температурный режим биосинтеза белка	Степень растворимости белка	Выход белка после очистки (мг/л)
pET28MBP-LysK		
37 °С (6 ч)	H	
18 °С (16–18 ч)	P+	2,55
pET28MBP-PM9		
37 °С (6 ч)	H	
18 °С (16–18 ч)	P++	4,95
pET28TIG-DnaseI		
37 °С (6 ч)	H	
18 °С (16–18 ч)	P+++	7,4
pET28MBP-NucA1		
37 °С (6 ч)	H	
18 °С (16–18 ч)	P+++	6,7
pET28TIG-NucA2		
37 °С (6 ч)	H	
18 °С (16–18 ч)	P++	4,8

Примечание: P — растворимый, H — нерастворимый, «+» — степень наработки растворимого белка.

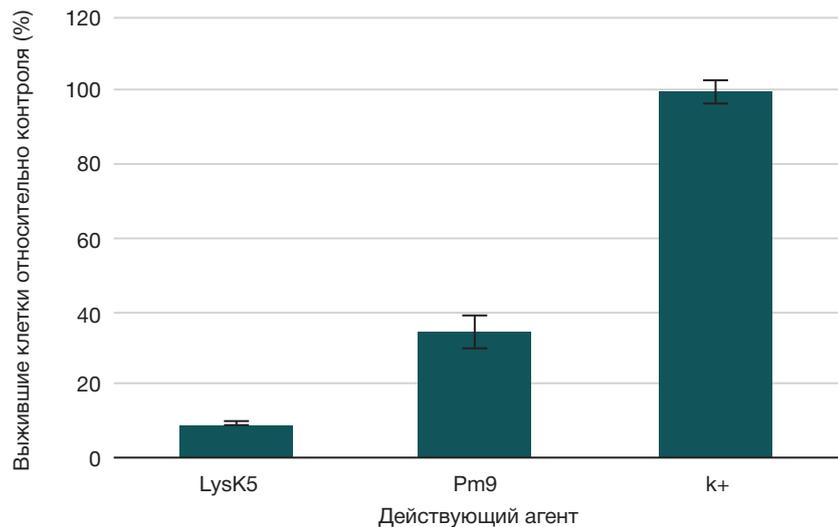


Рис. 3. Каталитическая активность двух эндолизинов против клеточной стенки бактерий *Staphylococcus aureus*. Оба рекомбинантных фермента обладают антибактериальной активностью, разрушая клеточную стенку. Эндолизин LysK, имеющий полноразмерный каталитический домен, обладает существенно большей антибактериальной активностью в отношении грамположительного патогена *Staphylococcus aureus*, по сравнению с эндолизин PM9, имеющим усеченный каталитический домен

антибактериальное действие и способны вызывать лизис клеток *Staphylococcus aureus*, однако эндолизин бактериофага PM9 с усеченным каталитическим доменом все же обладает меньшей активностью (почти в четыре раза ниже относительно эндолизина LysK). По-видимому, такие варианты эволюционно менее выигрышны для вирусов, поэтому их количество в геномах фагов существенно меньше, чем количество полноразмерных вариантов генов эндолизинов. Возможно, что гены, кодирующие такие молекулы, являются «эволюционным мусором» в геномах бактериофагов, но их точная биологическая роль пока не очень ясна. Эти данные указывают на то, что для создания эффективных антибактериальных препаратов все же имеет смысл выбирать эндолизин с полноценным каталитическим доменом (либо несколько молекул с разными по специфичности каталитическими доменами).

В качестве следующего этапа мы проверили три полученных нуклеазы на способность разрушать биопленки *Staphylococcus aureus* за счет разрушения матрикса, состоящего из экстраклеточной ДНК. Ранее было показано, что дезоксирибонуклеаза I способна разрушать бактериальные биопленки [8], однако для неспецифических нуклеаз таких исследований не проводилось. Все три нуклеазы, выделенные нами в

виде препаратов рекомбинантных белков, а именно дезоксирибонуклеаза I человека, неспецифическая нуклеаза NucA1 из *Serratia marcescens* и неспецифическая нуклеаза NucA2 из *Anabaena sp.*, могут деградировать бактериальные биопленки (рис. 4). Из полученных результатов видно, что обе неспецифические нуклеазы имеют более высокую эффективность разрушения биопленок, что, возможно, связано с механизмом их действия. Их большая нуклеазная активность стала причиной широкого использования неспецифических нуклеаз для научных и биотехнологических задач, в частности разработки коммерческого препарата *Benzonase* от компании *Merck*. Таким образом, неспецифические нуклеазы могут подойти для создания антибактериальных препаратов, обладающих способностью разрушать биопленки. Поэтому при дальнейшей разработке комплексного антибактериального препарата рационально ориентироваться на физико-химические свойства таких ферментов, а также на результаты доклинических исследований. Фермент ДНКазы I хоть и проявляет меньшую активность, но плюсом является его происхождение, что потенциально минимизирует иммуногенность препарата. Также необходимо отметить, что уже существуют коммерческие препараты на основе этого рекомбинантного

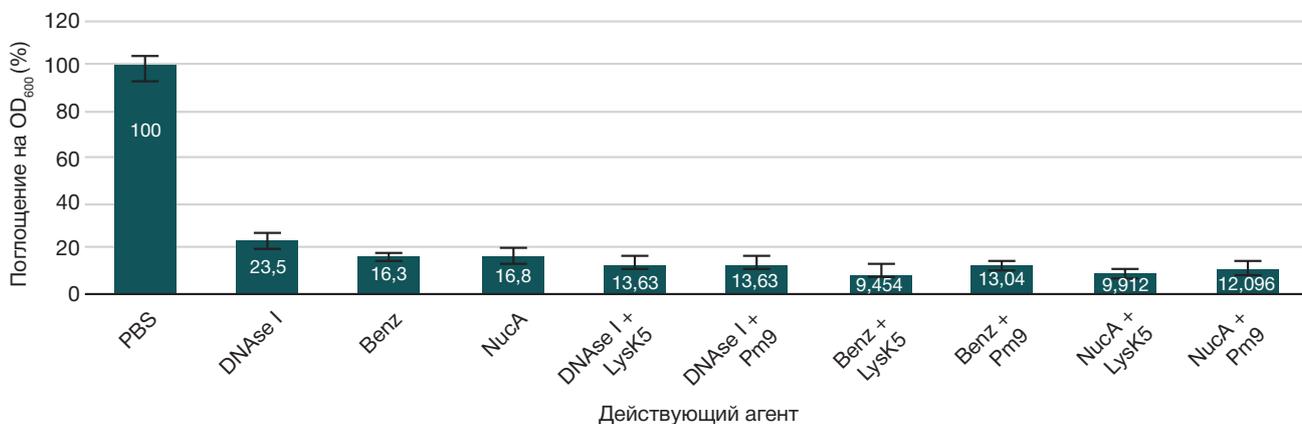


Рис. 4. Разрушение бактериальных биопленок *Staphylococcus aureus* препаратами рекомбинантных нуклеаз, а также комбинированными препаратами, совмещающими разные каталитические активности (эндолизин + нуклеаза). Неспецифические нуклеазы обладают большей активностью в отношении разрушения бактериальных биопленок по сравнению с ДНКазой I. Комбинации ферментов с разной специфичностью в одном препарате усиливают антибактериальное действие

фермента (Dornase Alfa и его аналоги), которые уже имеют терапевтическое применение.

Последней и основной задачей настоящей работы была проверка эффективности антибактериального действия комбинированного препарата, сочетающего минимум две разные каталитические активности в отношении биопленок *Staphylococcus aureus*. Так, мы планировали протестировать разные комбинации из двух молекул эндолизинов и трех нуклеаз. В наших условиях наилучшие результаты показали комбинации полноразмерного эндолизина LysK и нуклеаз, что можно объяснить лучшей лизирующей активностью этого фермента, по сравнению с эндолизином PM9 с усеченным каталитическим доменом (рис. 4). Все три используемые нуклеазы были активны в комбинированном препарате, однако наилучшие результаты показали неспецифические нуклеазы. Возможно, это связано с экспериментальными условиями и при подборе оптимального реакционного буфера ДНКазы I тоже дала бы сравнимую эффективность. Однако разница в механизмах ферментативной активности может играть значительную роль при практическом применении препаратов. Таким образом, неспецифические нуклеазы могут быть использованы в комбинированных антибактериальных препаратах на основе рекомбинантных белков, либо могут потенцировать действие антибиотиков при их действии на бактериальные биопленки.

Резюмируя полученные результаты, мы подобрали условия наработки и хроматографической очистки двух эндолизинов (LysK и PM9), обладающих активностью против *Staphylococcus aureus*, а также трех нуклеаз (NucA1, NucA2 и DNase I), способных разрушать ДНК-матрикс бактериальных биопленок. Для этого мы использовали скрининговый подход по наработке ферментов в комбинации с желперными полипептидами. Далее мы продемонстрировали антибактериальную активность этих ферментов, а также их комплексное действие против биопленок *Staphylococcus aureus*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Текущий кризис антибиотикорезистентности, вызванный широким использованием антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве, вынуждает искать альтернативные терапевтические средства для борьбы с патогенными бактериями. Такие препараты можно было бы использовать как поддержку для терапии традиционными антибиотиками либо как монотерапию, исключая применение антибиотиков в ряде случаев. Одним из перспективных направлений является разработка антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих бактериолитическим действием [14]. Наиболее интересны эндолизины — бактериолитические белки, при помощи которых бактериофаги лизируют зараженные бактериальные клетки во время вирусной инфекции. Эндолизины имеют модульную структуру и обычно содержат два или три домена, отвечающие за распознавание определенных бактерий, а также каталитическую активность в отношении компонентов клеточной стенки. В настоящее время эти молекулы довольно хорошо изучены и на их основе пробуют разрабатывать антимикробные препараты — энзиботики [14]. По мере открытия и описания геномов новых бактериофагов, копятся данные по неохарактеризованным вирусным белкам, в том числе по эндолизинам. Часть этих эндолизинов имеет усеченные каталитические

домены, биологический смысл этого не совсем понятен. В этой работе мы сравнили два эндолизина, кодируемые двумя бактериофагами *Staphylococcus aureus* K и PM9. Один из них хорошо известен и имеет полноценную трехдоменную структуру, включающую каталитические домены (пептидазный и амидазный), а также узнающий домен [15], а второй является неохарактеризованным эндолизином со значительно усеченным каталитическим доменом и идентичным по последовательности связывающим доменом. При наработке в гетерологичной системе *E. coli* оба эндолизина агрегируют и формируют тельца включения. Для получения функциональных препаратов этих белков, обладающих активностью, мы воспользовались методологическим подходом, в котором растворимость целевого рекомбинантного белка обеспечивает вспомогательный полипептид, который находится на N-конце химерной белковой молекулы (рис. 2, табл. 2). После успешной наработки химерных молекул в растворимой форме вспомогательный пептид отщепляли при помощи TEV-протеазы и использовали белки для постановки тестов на антимикробную активность против клеток *Staphylococcus aureus*. Наши результаты указывают на то, что эндолизин фага PM9 с усеченным каталитическим доменом проявляет существенно более низкую активность в отношении клеток *Staphylococcus aureus* (рис. 3). При этом оба эндолизина имеют полностью идентичный по аминокислотному составу узнающий домен, что нивелирует разницу при связывании молекул с рецепторами бактериальных клеток. По причине низкой активности использование таких ферментов, несмотря на их большую компактность и возможные выгодные отличия физико-химических свойств от полноразмерных молекул, является неоправданным. Поэтому для разработки препаратов на основе эндолизинов нужно выбирать варианты с полноразмерными доменами. Исследования и разработки в области комбинаторной инженерии эндолизинов демонстрируют потенциал этих белков для применения в качестве антибактериальных средств [4, 14]. Эндолизины с полноценным каталитическим доменом ожидаемо обладают большей антибактериальной активностью, нежели варианты с усеченным каталитическим доменом. При этом связывающий домен таких усеченных вариантов эндолизинов полностью функционален, что таргетирует эти молекулы на клеточные рецепторы бактерий во время инфекции, но биологическая роль этого пока не очень понятна. Можно предположить, что такие формы молекул эндолизинов являются либо эволюционно-переходными вариантами, либо рудиментарными ферментами, от которых жизненный цикл вируса уже не очень зависит, но в геноме вирусов они сохранились.

Однако необходимо отметить, что антибактериальное действие эндолизинов является ограниченным в отношении бактериальных биопленок, которые часто образуют патогенные бактерии. Поскольку структура бактериальных биопленок стабилизируется внеклеточным матриксом, состоящим из различных биоорганических молекул, то связи между ними являются потенциальной мишенью для разрушения биопленки [6]. Одним из компонентов такого матрикса биопленок является внеклеточная ДНК, которая образует устойчивые структуры, стабилизирующие биопленку [16, 17]. Ранее было показано, что каталитическая активность дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I), гидролизующая фосфодиэфирные связи между субъединицами нуклеиновых кислот, может обеспечивать разрушение бактериальных биопленок,

которые образуются при инфекции [8]. Мы решили проверить на аналогичную активность еще две нуклеазы с неспецифической активностью против ДНК и РНК — нуклеазу NucA из бактерии *Serratia marcescens* и нуклеазу NucA из *Anabaena sp.* и сравнить их эффективность с ДНКазой I человека. Для этого мы получили все три нуклеазы в виде препаратов гомогенных белков, а поскольку эти белки также агрегируют при наработке в *E. coli*, мы провели скрининг и выбрали подходящие вспомогательные белки для наработки нуклеаз в растворимой форме (рис. 2, табл. 2). Выделенные белки показывают активность против биопленок *Staphylococcus aureus*, притом обе неспецифические нуклеазы NucA1 из *Serratia marcescens* и NucA2 из *Anabaena sp.* наиболее активны среди трех в тесте по разрушению биопленок (рис. 4). Таким образом, для разработки антибактериальных препаратов потенциально могут подойти любые нуклеазы, при этом можно ориентироваться на более подходящие физико-химические свойства ферментов и профиль безопасности на основе результатов доклинических исследований. Возможно, в таком препарате человеческая ДНКаза I предпочтительна, несмотря на меньшую каталитическую активность, поскольку на нее иммунный ответ будет незначительный, в отличие от рекомбинантных белков чужеродной природы. К тому же, на основе этого фермента уже есть коммерческие препараты для облегчения симптомов муковисцидоза, а также бактериальных осложнений после вирусных инфекций [18].

Совмещение двух (или более) каталитических активностей в одном антибактериальном препарате позволяет воздействовать на разные структуры бактериальной биопленки при инфекции [19]. Так, ферменты, разрушающие внеклеточные структурные компоненты биопленок, могут предоставить доступ к внутренним слоям бактериальных клеток бактериолитическим ферментам и усилить эффективность их действия на отдельные клетки бактерий [9]. Далее мы попробовали скомбинировать эндолизин с нуклеазами, которые мы получили в ходе нашей работы. Мы оценивали действие этих комбинированных препаратов в отношении биопленок *Staphylococcus aureus*, а также оценивали их литическую активность против клеток этого грамположительного бактериального патогена. Предсказуемо лучший результат при совместном действии дали пары, где полноразмерный

эндолизин LysK работал в комбинации с одной из трех нуклеаз (рис. 4). Комбинации эндолизина с усеченным каталитическим доменом и нуклеаз не дали столь высоких результатов, что было ожидаемо, исходя из результатов тестирования антимикробного действия этого эндолизина против клеток *Staphylococcus aureus* (рис. 3). Можно заключить, что использование двух (или более) каталитических активностей, которые обеспечивают разные ферменты в одном антибактериальном препарате, является перспективным при лечении бактериальных инфекций, осложненных образованием биопленок. Использование нуклеаз (как неспецифических, так и ДНК-специфических) в подобных препаратах видится оправданным, поскольку их активность существенно деградирует биопленки бактерий, обеспечивая потенцирующий эффект антибактериального действия как эндолизинов, так и традиционных антибиотиков.

Выводы

Результаты настоящей работы демонстрируют возможность получения комбинированных препаратов антибактериальных ферментов на основе эндолитических ферментов бактериофагов и ферментов, деградирующих бактериальные биопленки. Мы показали, что эндолизин PM9 с усеченным каталитическим доменом проявляет меньшую бактериолитическую активность, чем эндолизин LysK с полноразмерным каталитическим доменом, а неспецифические нуклеазы обладают лучшей разрушающей активностью в отношении бактериальных биопленок. Мы также провели сравнительный анализ эффективности действия нескольких комбинаций ферментов против бактерий *Staphylococcus aureus* и их биопленок. Результаты показывают синергическое антимикробное действие очищенных препаратов рекомбинантных эндолизинов LysK и PM9, а также неспецифических (NucA1 и NucA2) и ДНК-специфических (DNase I) нуклеаз. В перспективе такой подход к инженерии комбинированных препаратов, включающих в себя два или три разных вида каталитической активности, поможет получать терапевтические средства с усиленными антибактериальными свойствами против микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, которые склонны к образованию биопленок при инфекциях.

Литература

1. Naghavi Mohsen, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*. 2024; 404 (10459), 1199–226.
2. Liu H, Hu Z, Li M, et al. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *J Biomed Sci*. 2023; 30, 29. DOI:10.1186/s12929-023-00919-1.
3. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31: Available from: 10.1128/cmr.00071-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00071-17>
4. Wang Y, Wang X, Liu X, Lin B. Research Progress on Strategies for Improving the Enzyme Properties of Bacteriophage Endolysins. *J Microbiol Biotechnol*. 2024; 34: 1189–96. Available from: <https://doi.org/10.4014/jmb.2312.12050>.
5. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (2): 124. DOI: 10.3390/antibiotics10020124. PMID: 33525684; PMCID: PMC7912344.
6. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol*. 2022; 20: 608–620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
7. Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, et al. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *npj Biofilms Microbiomes*. 2023; 9: 63 Available from: <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
8. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012; 65 (2): 73–7. DOI: 10.1038/ja.2011.113. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
9. Bartlett HP, Dawson CC, Glickman CM, Osborn DW, Evans CR, Garcia BJ, et al. Targeting intracellular nontuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* with a bactericidal enzymatic cocktail. *Microbiol Spectr*. 2024; 12 (5): e0353423. DOI: 10.1128/spectrum.03534-23. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38534149; PMCID: PMC11064574.

10. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, et al. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 380–395. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>.
11. Zakharova MV, Mubarakshina EK, Nagornykh MO. Construction of Expression Vectors for Efficient Production of Recombinant Proteins in *E. coli* for the Development of Therapeutic Drugs. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2024; 18: 254–62. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1990750823600516>.
12. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014; 5: 63. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063. PMID: 24600443; PMCID: PMC3928792.
13. Захарова М. В., Загоскин А. А., Иванов П. А., Нагорных М. О. Получение рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в *E. coli* для использования в синтезе мРНК in vitro. *Вестник РГМУ.* 2023; (6): 36–44. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.058.
14. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021; 13 (4): 680. DOI: 10.3390/v13040680. PMID: 33920965; PMCID: PMC8071259.
15. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. 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 (20): 7161–4. DOI: 10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005. PMID: 16199588; PMCID: PMC1251611.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
17. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28 (8): 668–81. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32663461.
18. Gustafson AM, Larrain CM, Friedman LR, Repkorwich R, Anidi IU, Forrest KM, et al. Novel management of pseudomonas biofilm-like structure in a post-pneumectomy empyema. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1458652. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1458652. PMID: 39483118; PMCID: PMC11525003.
19. Quan Lin, Maokun Sheng, Yanjun Tian, Bing Li, Zhaodi Kang, Yingying Yang, et al. Antibiofilm activity and synergistic effects of DNase I and lysostaphin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Quality and Safety.* 2024; 8: fyae024. Available from: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae024>.

References

1. Naghavi Mohsen, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet.* 2024; 404 (10459), 1199–226.
2. Liu H, Hu Z, Li M, et al. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *J Biomed Sci.* 2023; 30, 29. DOI:10.1186/s12929-023-00919-1.
3. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31: Available from: 10.1128/cmr.00071-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00071-17>
4. Wang Y, Wang X, Liu X, Lin B. Research Progress on Strategies for Improving the Enzyme Properties of Bacteriophage Endolysins. *J Microbiol Biotechnol.* 2024; 34: 1189–96. Available from: <https://doi.org/10.4014/jmb.2312.12050>.
5. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (2): 124. DOI: 10.3390/antibiotics10020124. PMID: 33525684; PMCID: PMC7912344.
6. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20: 608–620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
7. Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, et al. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *npj Biofilms Microbiomes.* 2023; 9: 63 Available from: <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
8. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo).* 2012; 65 (2): 73–7. DOI: 10.1038/ja.2011.113. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
9. Bartlett HP, Dawson CC, Glickman CM, Osborn DW, Evans CR, Garcia BJ, et al. Targeting intracellular nontuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* with a bactericidal enzymatic cocktail. *Microbiol Spectr.* 2024; 12 (5): e0353423. DOI: 10.1128/spectrum.03534-23. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38534149; PMCID: PMC11064574.
10. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 380–395. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>.
11. Zakharova MV, Mubarakshina EK, Nagornykh MO. Construction of Expression Vectors for Efficient Production of Recombinant Proteins in *E. coli* for the Development of Therapeutic Drugs. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2024; 18: 254–62. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1990750823600516>.
12. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014; 5: 63. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063. PMID: 24600443; PMCID: PMC3928792.
13. Zakharova MV, Zagoskin AA, Ivanov RA, Nagornykh MO. Preparation of a recombinant ribonuclease inhibitor in *E. coli* for use in mRNA synthesis in vitro. *Bulletin of RSMU.* 2023; (6): 34–41. DOI: 10.24075/brsmu.2023.058.
14. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021; 13 (4): 680. DOI: 10.3390/v13040680. PMID: 33920965; PMCID: PMC8071259.
15. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. 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 (20): 7161–4. DOI: 10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005. PMID: 16199588; PMCID: PMC1251611.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
17. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28 (8): 668–81. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32663461.
18. Gustafson AM, Larrain CM, Friedman LR, Repkorwich R, Anidi IU, Forrest KM, et al. Novel management of pseudomonas biofilm-like structure in a post-pneumectomy empyema. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1458652. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1458652. PMID: 39483118; PMCID: PMC11525003.
19. Quan Lin, Maokun Sheng, Yanjun Tian, Bing Li, Zhaodi Kang, Yingying Yang, et al. Antibiofilm activity and synergistic effects of DNase I and lysostaphin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Quality and Safety.* 2024; 8: fyae024. Available from: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae024>.