

Bakterie, w celu obrony przed czynnikami fizycznymi i chemicznymi, antybiotykami czy układem immunologicznym, wykształciły zdolność do formowania skomplikowanych struktur zwanych biofilmem. Biofilm to nic innego jak grupa komórek zamieszkujących mikrokolonie otoczone i przytwierdzone do powierzchni poprzez zewnątrzkomórkową śluzowatą substancję złożoną głównie z cukrów oraz białek, kwasów nukleinowych i tłuszczów. Ta pozakomórkowa macierz jest istotą biofilmu, stanowiącą nawet do 90% całości jego biomasy, i to ona odpowiada za brak aktywności leków czy innych czynników względem komórek bakteryjnych zanurzonych w biofilmie. Tylko poprzez zniszczenie tej śluzowatej struktury można zyskać dostęp do ukrytych w niej bakterii. Podpowieź jak to zrobić możemy znaleźć w naturze, wśród naturalnych wrogów bakterii - bakteriofagów, które są wirusami infekującymi jedynie komórki bakteryjne. Wśród właśnie tych wirusów można wyróżnić takie, które w swojej budowie posiadają specjalny enzym - depolimerazę, i tylko one są zdolne do swobodnego wnikania w głąb biofilmu, docierania do mikrokolonii i infekowania tworzących je bakterii. W ramach niniejszego projektu planujemy uzyskanie właśnie białek pochodzenia fagowego, degradujących cukry otoczkowe bakterii oraz cukry budujące macierz biofilmu. Celem jest poznanie właściwości i struktury nowych enzymów fagowych - depolimeraz oraz efektów ich działania. Pierwszym zadaniem na drodze do osiągnięcia celu jest ustalenie odpowiednich warunków na różnych etapach produkcji białek rekombinowanych z użyciem procedur inżynierii genetycznej. Zamierzamy poznać ich strukturę na podstawie uzyskanych kryształów białkowych oraz określić aktywność w zależności od cech środowiska, w którym się znajdują. Najciekawszym zadaniem będzie sprawdzenie jak enzymy te działają względem pojedynczych bakterii *Klebsiella*, osłoniętych cukrową otoczką i względem bakterii *Klebsiella* żyjących w skomplikowanej strukturze biofilmu, otoczonych cukrową macierzą. Porównamy również aktywność enzymu wobec biofilmu, z działaniem całych cząstek fagowych, z których te enzymy pochodzą. W temacie współwystępowania bakteriofagów i biofilmów nasuwa się wiele pytań, na które postaramy się odpowiedzieć. Zauważono bowiem, że dłuższe traktowanie biofilmu fagami, pomimo początkowego usuwania tej struktury, po pewnym czasie może powodować jej rozwój. Zastanawiamy się, czy taki mechanizm ma miejsce jedynie w przypadku całych cząstek fagowych i jest związany z niszczeniem komórek bakteryjnych (bakteriofagi namnażają się w bakteryjnym gospodarzu i aby się uwolnić powodują liżę komórek) czy sam enzym wywoła podobny skutek? Kolejnym pytaniem, jak dotąd pozostającym bez odpowiedzi, jest, czy obecność enzymu w biofilmie będzie prowadzić do powstania bakterii opornych na ten enzym, czy tak dzieję się tylko w przypadku zdolnych do przeprowadzenia infekcji bakteriofagów. Sprawdzimy zatem, czy wspomniany fenomen ma miejsce w przypadku depolimeraz i określimy czy cecha ta będzie cechą stałą (obecną również w nowych pokoleniach bakterii). Ciekawą teorią, którą zamierzamy zweryfikować jest również powiązanie efektów działania fagów z etapem rozwoju biofilmu. Być może biofilm odpowiednio rozwinięty, taki który w swojej strukturze posiada liczne pory i kanały, łatwiej usunąć z powierzchni. Bakteriofag, który dostanie się do wnętrza biofilmu z łatwością może dostać się do samej podstawy tej struktury. Tutaj dzięki aktywności enzymatycznej może spowodować złuszczenie całego biofilmu, bez unicestwiania pojedynczych komórek. Chcemy zatem przetestować tą hipotezę zarówno w przypadku enzymów i całych cząstek fagowych. Podejmiemy również próby zastosowania enzymów/fagów w połączeniu z antybiotykami. Tym samym chcemy potwierdzić efekt ewentualnego rozluźnienia struktury biofilmu i ułatwienia penetracji leku do wnętrza biofilmu.

W literaturze można znaleźć potwierdzenie skuteczności depolimeraz w zwalczaniu infekcji na modelach zwierzęcych, jak również umożliwienia penetracji antybiotyków w głąb biofilmu na skutek działania tych enzymów. Jednak porównanie wpływu całych cząstek fagowych i wywodzących się z nich depolimeraz na biofilm *Klebsiella* (wszechobecny w środowisku, jak również w warunkach szpitalnych) nie został jak dotąd opisany w literaturze. Choć zaproponowany projekt ma charakter czysto poznawczy, odpowiedzi na postawione pytania mogą pomóc rozwiązać przynajmniej część wątpliwości związanych z hipotetycznym zastosowaniem depolimeraz w zwalczaniu trudnego do usunięcia biofilmu bakteryjnego. Pomimo faktu, że pałeczki z gatunku *Klebsiella pneumoniae* są oportunistycznymi patogenami, wśród których zarówno izolaty pochodzenia szpitalnego jak i środowiskowego są w takim samym stopniu niebezpieczne, badania nad fagami specyficznymi względem *Klebsiella*, nie są jeszcze szeroko rozpowszechnione, dlatego też zdecydowaliśmy się zgłębić ten temat.