

Popularnonaukowe streszczenie projektu

Założeniem i celem projektu jest w pierwszej kolejności dokonanie wyboru z kolekcji naszego laboratorium 4-6 bakteriofagów (wirusów infekujących bakterie) zjadliwych wobec laseczek wąglika *Bacillus anthracis*. Podstawowym kryterium selekcji będzie różnorodność genetyczna (wzory restrykcyjne) i zakres gospodarza. Następnym krokiem będzie próba sklonowania kodowanych przez nie endolizyn, enzymów o zdolności rozkładania peptydoglikanu bakterii. Głównym celem projektu będzie analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych uzyskanych w ten sposób białek oraz ocena ich aktywności bakteriobójczej wobec komórek wegetatywnych *B. anthracis* i innych bakterii z grupy *B. cereus*, a w szczególności wobec endospor. Fagi kodujące nieopisane dotąd lizyny będą poddane dokładnej charakterystyce (morfologia, plon faga, efektywność i dynamika infekcji), w tym ocenie zdolności wiązania się do spor.

Dzięki przeprowadzeniu sekwencjonowania całych genomów wybranych fagów będzie można za pomocą analizy bioinformatycznej nie tylko ustalić sekwencje genów endolizyn będących docelowymi obiektami badań, ale również zidentyfikować pozostałe białka tych wirusów, którym następnie przypisze się przypuszczalne funkcje. W tym celu użyte będą bazy danych i programy komputerowe. Za pomocą klonowania molekularnego planuje się uzyskać białka enzymatyczne kodowane przez wybrane fagi, które będą następnie oczyszczone przy użyciu chromatografii powinowactwa. Do przeprowadzenia klonowania użyte będą plazmidowe wektory genetyczne oraz bakteryjne komórki kompetentne *Escherichia coli* odpowiednie do uzyskiwania białek w układach heterologicznych. W ostatnim etapie badań czyste preparaty białkowe będą badane w kierunku aktywności biologicznej, tzn. oceny zakresu działania oraz skuteczności w zwalczaniu endospor oraz żywych bakterii wąglika. Otrzymując i badając kilka endolizyn kodowanych przez różne bakteriofagi lityczne dla laseczek wąglika spodziewamy się wykrycia różnic w sekwencji tych enzymów, które mogą skutkować różnicami w ich aktywności biologicznej. Oceniony będzie stopień zróżnicowania sekwencji białek, również w odniesieniu do lizyny PlyG. Ponadto, aktywność lizyn będzie sprawdzona w warunkach różnych temperatur i pH, aby ocenić ich stabilność w środowisku.

Podjęcie tych badań ma wielorakie uzasadnienie. Laseczka wąglika jest czołowym patogenem leżącym w kręgu zainteresowań bioterrorystów, a wziewna forma zakażenia jest niezwykle trudna do wyleczenia i niemal zawsze śmiertelna bez natychmiastowej antybiotykoterapii. Zdolność tworzenia endospor ułatwia stosowanie aerozoli tych bakterii. Niezwykła oporność przetrwalników na warunki środowiskowe daje im przewagę nad innymi czynnikami biologicznymi, które wymagają skomplikowanych procedur uniemożliwiających ich degradację w chmurach biologicznych. Dodatkowo zmagamy się obecnie z poważnym problemem rosnącej wśród bakterii antybiooporności, dlatego ważne jest znalezienie nowych skutecznych metod leczenia infekcji oraz dekontaminacji, a tu obiecująco roją endolizyny fagowe. Do oczyszczania skażonej węglikiem gleby używa się zwyczajowo formaldehydu lub kwasu nadoctowego; środki te są skuteczne w zwalczaniu spor, jednak szkodliwe dla środowiska. Po opracowaniu metod produkcji i stosowania, fagi lub kodowane przez nie lizyny mogłyby znaleźć zastosowanie jako naturalne i przyjazne środowisku dezynfektanty.

Bakteriofagi wyizolowane do tej pory i otrzymane kodowane przez nie endolizyny działają litycznie wyłącznie na komórki wegetatywne. Najbardziej znaną lizyną kodowaną przez faga infekującego *B. anthracis* jest PlyG z faga Gamma, cechująca się wysoką specyficznością i dużym potencjałem w walce z laseczkami wąglika, jednakże jedynie umiarkowanie skuteczna w degradacji spor, nawet w obecności induktorów kiełkowania. Izolowanie nowych fagów oraz produkcja ich enzymów litycznych o potwierdzonej aktywności wobec przetrwalników mogłaby pozwolić na bardziej skuteczną walkę z tym groźnym patogenem.