

ANALIZA MOLEKULARNA STABILNOŚCI TERMICZNEJ ENDOLIZYN Z EKSTREMOFILNYCH BAKTERIOFAGÓW NA DRODZE ZWALCZANIA BAKTERII GRAM-UJEMNYCH.

Oporność bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe jest naturalnym procesem obserwowanym od czasu odkrycia pierwszego antybiotyku, penicyliny przez Sir Alexandra Fleminga w 1928 r. Nadużywanie środków przeciwdrobnoustrojowych zwiększyło tempo rozwoju oporności i pilnie potrzebne są nowe działania w celu opracowania alternatyw dla konwencjonalnych antybiotyków. Wzrost liczby bakterii wielolekoopornych jest szczególnie niepokojący w przypadku bakterii Gram-ujemnych, w tym *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*, które są czynnikami etiologicznymi szerokiego spektrum zakażeń szpitalnych. Jednym z możliwych rozwiązań problemu oporności na antybiotyki jest użycie enzymów pochodzących z bakteriofagów, zwanych endolizynami, które degradują warstwę peptydoglikanu (PG) ściany komórkowej bakterii w celu uwolnienia potomstwa faga pod koniec cyklu litycznego.

Dodanie rekombinowanej endolizyny do bakterii Gram-dodatnich wywołuje lizę osmotyczną i w konsekwencji śmierć komórki. W przypadku bakterii Gram-ujemnych egzogenne działanie endolizyn jest utrudnione przez błonę zewnętrzną (OM), która osłania warstwę peptydoglikanu. Projekty dotyczące tej grupy enzymów były często opisywane jako ryzykowne i określane jako strefa podwyższonego ryzyka. Jednak pomyślnie zastosowanie lizyn fagowych przeciwko bakteriom Gram-dodatnim i pilna potrzeba opracowania nowych środków bakteriobójczych przeciwko patogenom Gram-ujemnym skłoniły naukowców do znalezienia rozwiązania umożliwiającego pokonanie bariery OM. Obecnie stosuje się wiele różnych technik w celu zwiększenia skuteczności zmodyfikowanych endolizyn stosowanych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. W ramach projektu jedna z takich technik o nazwie VersaTile (nowatorska metoda edycji DNA), zostanie wykorzystana do skonstruowania lizyn przeciwko tym patogenom.

Chociaż rozpuszczalność i oporność na działanie wysokiej temperatury mają również duże znaczenie w badaniach nad endolizynami, prawie nie istnieją projekty badające to zjawisko w kontekście enzymów litycznych. Mamy duże doświadczenie w pracy z endolizynami ze środowisk ekstremofilnych, odkrywając dwie, endolizyny Ph2119 i Ts2631 bakteriofagów *Thermus scotoductus*, spośród nielicznych, znanych termofilnych enzymów litycznych. Bezsprzecznie, białka termostabilne mają przewagę nad ich mezofilnymi odpowiednikami zarówno w procesach medycznych jak i biotechnologicznych, chociażby ze względu na odporność na denaturację w podwyższonej temperaturze i proteolizę.

Dlatego też głównym celem niniejszego projektu jest określenie molekularnych podstaw termostabilności endolizyn pochodzących z bakteriofagów infekujących bakterie z rodzaju *Thermus*. Do badania stabilności termicznej enzymów litycznych i ich pochodnych zostanie wykorzystana najnowocześniejsza metodologia, nano-różnicowa fluorymetria skaningowa (nanoDSF).

W aspekcie rozwoju technologii umożliwiających skuteczne zwiększanie przepuszczalności błony zewnętrznej, naszym celem jest skonstruowanie termostabilnego wariantu enzymu litycznego o zwiększonej aktywności przeciwko mezofilnym patogenom Gram-ujemnym.

Spodziewamy się, że wyniki uzyskane w niniejszym projekcie stworzą podstawy do dalszych badań nad termostabilnością enzymów litycznych skierowanych przeciwko tym patogenom.