

**„Charakterystyka enzymów litycznych z bakterii z
rodzaju *Clostridium* wykazujących podobieństwo do eukariotycznych białek
rozpoznających peptydoglikan”
mgr Agnieszka Morzywolek**

Bakterie z rodzaju *Clostridium* to Gram-dodatnie beztlenowe laseczki, zdolne do wytwarzania zarodników oraz produkcji silnych toksyn. Fagowe i bakteryjne enzymy lityczne stanowią przykład czynników, które mogą być użyteczne w zwalczaniu bakterii patogennych. Analiza bioinformatyczna ujawniła w genomach kilku gatunków bakterii z rodzaju *Clostridium* obecność genów kodujących białka o cechach amidaz N-acetylmuramylo-L-alaninowych należących do rodziny AMI-2. Dalsze badania wykazały ich podobieństwo do eukariotycznych białek rozpoznających peptydoglikan z charakterystycznym motywem wiążącym jony Zn^{2+} .

W ramach niniejszej pracy scharakteryzowano i oceniono potencjał antybakteryjny trzech enzymów litycznych. Pierwszy z nich, nazwany LysB (224-aa), z profaga *C. botulinum* E3 strain Alaska E43 jest częścią kasety litycznej *lysB-holB*. Rekombinowane białko (27726 Da) poddano nadprodukcji, a następnie oczyszczono z bakterii *E. coli* Tuner(DE3) z wydajnością 37,5 mg z 1 litra hodowli bakteryjnej. Przy użyciu techniki sączenia molekularnego i ultrawiorowania analitycznego wykazano, że białko to w roztworze występuje w formie dimerycznej. Dane bioinformatyczne wsparte analizą modelu molekularnego LysB oraz badaniami opartymi o mutagenezę miejscowo-specyficzną wskazały, że pięć reszt aminokwasowych, H25, Y54, H126, S132 i C134, tworzy centrum katalityczne enzymu. Reszty zaangażowane w wiązanie jonu Zn^{2+} podkreślono. Analiza modelu molekularnego białka LysB sugeruje, że dwanaście innych reszt, M13, H43, N47, G48 W49, A50, L73, A75, H76, Q78, N81 i Y182, jest zaangażowanych w wiązanie cząsteczki kwasu lipotejchojowego, istotnego składnika ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich. Białko LysB wykazuje aktywność lityczną wobec bakterii należących do rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus* i *Deinococcus*, ale nie lizuje bakterii Gram-ujemnych. Optymalną aktywność lityczną białko LysB wykazuje w zakresie pH 4,0-7,5 przy braku NaCl. Dwa inne białka lityczne scharakteryzowane w niniejszej pracy, LysP (222-aa; 25690 Da) i LysPS (157-aa; 17840 Da) pochodzą odpowiednio z *C. perfringens* NCTC 8239 i *C. perfringens* ATCC 13124. Białka te różnią się jedynie 65 aminokwasową sekwencją na N-końcu, która jest obecna w białku LysP, ale nie ma jej w białku LysPS. Stwierdzono, że białko LysPS, w przeciwieństwie do enzymu LysP, jest niezwykle stabilne termicznie. Mutagenaza miejscowo-specyficzna dostarczyła bezpośredniego dowodu, że motyw wiążący jony Zn^{2+} jest krytyczny dla aktywności litycznej każdego z tych białek (LysP: H95, H193, C201; LysPS: H128, C136). Aktywność lityczną enzymów LysP i LysPS wykazano wobec bakterii należących do rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, ale nie stwierdzono jej wobec bakterii Gram-ujemnych. Ponadto wykazano, że spektrum lityczne LysPS jest szersze niż białka LysP, ponieważ wykazuje ono aktywność także względem *S. aureus* i *D. radiodurans*. W ramach niniejszej pracy wykazano także, że białko HolB kodowane przez gen będący elementem kasety litycznej *lysB-holB* *C. botulinum* E3 Alaska E43 działa jako holina.