

Vloga Centra odličnosti CIPKeBiP: Nosilna organizacija

Naslov projekta: Strukturni vpogled v mehanizem tvorbe površine bakterije *Clostridium difficile*

Koordinator projekta: **Prof.dr. Dušan Turk**

ARRS šifra projekta: J1-1709 (F)

Osnovnimi podatki o financiranju

Obdobje financiranja: 1.7.2019—30.6.2022

Obseg financiranja: 0,53 FTE/leto

Sodelujoče raziskovalne organizacije

ARRS šifra	Raziskovalna organizacija	Status
2990	Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov	Zasebni raziskovalni zavod (nosilna organizacija)
0106	Institut Jožef Stefan	Javni raziskovalni zavod
0104	Kemijski inštitut	Javni raziskovalni zavod
0787	Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo	Fakulteta

Sestava projektne skupine

Priimek in ime	ARRS šifra	Raziskovalno področje	Vloga
Guzelj Samo	52379	Farmacija	raziskovalec
Dr. Lindič Nataša	31952	Biokemija in molekularna biologija	raziskovalka
Dr. Minovski Nikola	29497	Farmacija	raziskovalec
Dr. Mravljak Janez	23419	Farmacija	raziskovalec
Dr. Novič Marjana	09775	Kemija	raziskovalka
Dr. Pajk Stane	28861	Farmacija	raziskovalec
Dr. Perdih Andrej	25493	Farmacija	raziskovalec
Dr. Turk Dušan	04988	Biokemija in molekularna biologija	vodja
Dr. Usenik Aleksandra	26515	Biokemija in molekularna biologija	raziskovalka

Vsebinski opis projekta

Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij je sestavljena iz proteinov in peptidoglikana z izraščajočimi sekundarnimi polisaharidi, ki se med različni vrstami razlikujejo v kemijski sestavi in strukturi. Sekundarni polisaharidi celične stene so kovalentno pritrjeni na peptidoglikan in lahko predstavljajo več kot polovico mase celične stene. Tvorijo gosto mrežo negativnih nabojev in vplivajo na kationsko homeostazo, prepustnost membrane, občutljivost na antibiotike in na preživetje v gostitelju. Pri številnih bakterijah delujejo tudi kot sidra, ki nekovalentno vežejo zunanjo, parakristalinično proteinsko površinsko plast, imenovano S-plast. Medtem ko smo strukturo S-plasti bakterije *Clostridium difficile* že deloma razjasnili, so mehanizmi odgovorni za organizacijo njene strukture in vezave na peptidoglikan še vedno slabo raziskani.

C. difficile je nevaren bolnišnični patogen. Ob porušeni črevesni mikrobioti pacienta spore bakterije *C. difficile* vzklijejo in infekcija, četudi zdravljena, se lahko ponovi in vodi do življenjsko nevarnih zapletov. Pogosta uporaba antibiotikov širokega spektra za zdravljenje okužb s *C. difficile* vodi v naraščanje števila proti antibiotikom (večkratno) odpornih sevov. Glede na to, da stik z gostiteljem poteka na površini bakterije in da je S-plast bakterije *C. difficile* esencialni virulenčni dejavnik, je vredno preučiti z njo povezane procese.

Manipulacije genov za encime, vpletene v biosintezo sekundarnih polisaharidov bakterije *C. difficile*, so pokazale, da njihove okvare vodijo do motenj bakterijske rasti, razpršene celične stene, okvar sidranja, spremenjenega nalaganja in izločanja sekundarnih polisaharidov, do okvar v morfologiji in izgradnji S-plasti, sprememb v tvorbi biofilmov in nenazadnje do sprememb v virulenci. Vse to nas je spodbudilo k raziskavam mehanizmov izgradnje S-plasti bakterije *C. difficile*, pri čemer se nameravamo osredotočiti predvsem na encime, ki so vključeni v biosintezo sekundarnih polisaharidov.

Poleg tega lahko karakterizacija omenjenih encimov razširi naše razumevanje biogeneze ostalih polimerov bakterijskih celičnih sten.

S predlaganim projektom želimo pridobiti nov vpogled v mehanizme biosinteze sekundarnih polisaharidov in določiti njihov vpliv na izgradnjo S-plasti. Preučevali bomo tri skupine encimov, ki sodelujejo pri biosintezi sekundarnih polisaharidov (encime, vključene v pretvorbo manoze, glikoziltransferaze in encime, ki pripenjajo sekundarne polisaharide na peptidoglikan). Uporabili bomo komplementarne pristope molekularne biologije, analize kristalnih struktur, meritev encimskih aktivnosti, strukturno podprtega virtualnega rešetanja ligandov, klasične sinteze inhibitorjev, biokemijske analize, masne spektrometrije in mikroskopije (optične, elektronske in CryoEM) za opazovanje (fragmentov) nativnih in gensko spremenjenih bakterij ter bakterij, tretiranih z inhibitorji. Verjamemo, da ima sistematično raziskovanje celotne skupine encimov biosinteze sekundarnih polisaharidov potencial za temeljna odkritja v zvezi z njihovimi vlogami pri biosintezi sekundarnih polisaharidov in izgradnji S-plasti. Uspešen izid tega projekta bo postavil temelje novih programov odkrivanja zdravil, ki imajo potencial izboljšati zdravljenje življenjsko nevarnih okužb z bakterijo *C. difficile* na vrstno specifičen način in s tem zmanjšati tveganje za širitev odpornosti proti antibiotikom.

Faze projekta in njihova realizacija

Projekt se je pred kratkim začel in trenutno smo v prvi fazi eksperimentalnega dela.

Bibliografske reference

Publikacije bomo začeli pripravljati ko bomo pridobili primerne eksperimentalne rezultate.