

Vloga CIPKeBiP-a v projektu: Sodelujoča organizacija  
 Naslov projekta: **Inhibicija prenove celične stene *Staphylococcus aureus***  
 Koordinator: **Prof. dr. Dušan Turk**  
 ARRS šifra: J1-8152 (F)

Osnovni podatki o financiranju  
 Trajanje projekta: 1.5.2017 – 30.4.2020

#### Sestava CIPKeBiP projektne skupine

| Priimek in ime      | ARRS šifra | Raziskovalno področje                    | vloga              |
|---------------------|------------|------------------------------------------|--------------------|
| Anderluh Marko      | 21456      | Farmacija                                | Raziskovalec       |
| Borišek Jure        | 35380      | Kemija / Strukturna kemija               | Raziskovalec       |
| Hrast Martina       | 32036      | Farmacija                                | Raziskovalec       |
| Karničar Katarina   | 32503      | Biotehnologija / Mikrobna biotehnologija | Raziskovalec       |
| Knez Damijan        | 36438      | Farmacija                                | Raziskovalec       |
| Lindič Nataša       | 31952      | Biokemija in molekularna biologija       | Raziskovalec       |
| Novič Marjana       | 09775      | Kemija                                   | Raziskovalec       |
| Pintar Sara         | 36346      | Biokemija in molekularna biologija       | Mladi Raziskovalec |
| Taler - Verčič Ajda | 29544      | Biokemija in molekularna biologija       | Raziskovalec       |
| Turk Dušan          | 04988      | Biokemija in molekularna biologija       | Vodja              |

#### Povzetek

Bakterijske celice so obdane s celično steno, ki jim daje obliko in vzdržuje njihovo strukturno stabilnost. Celična stena je ogromna peptidoglikanska mreža, sestavljena iz polisaharidnih verig, ki so prečno povezane s peptidnimi mostički. Med rastjo in delitvijo celice se mora peptidoglikanska mreža preoblikovati. Ko je združba bakterij izpostavljena neugodnim pogojem, začne tvoriti biofilm. Biofilm je skupnost mikrobnih celic, obdanih z zunajceličnim polimerom, ki je sestavljen iz polisaharidov, DNA in proteinov. Celice lahko biofilm tudi zapustijo, potujejo v okolico in kolonizirajo nove niše. Za procese preoblikovanja celične stene, tvorbe biofilma in širjenja bakterij v okolico so potrebni encimi, ki sintetizirajo in razgrajujejo komponente celične stene in biofilmov. Do sedaj so bili na podlagi sekvenc DNA določeni številni proteini, ki naj bi bili udeleženi pri preoblikovanju celične stene, vendar jih je le malo raziskanih in okarakteriziranih, njihova vloga pri tvorbi biofilmov pa je še dokaj neraziskana.

Bakterija *S. aureus* je široko razširjen oportunistični patogen, ki kolonizira ljudi in živali. Najdemo ga na koži in sluznicah, vendar v večini primerov zdravim posameznikom ne povzroča težav. Ko pa pride do poškodb na koži ali sluznici, bakterije vstopijo v telo, kjer lahko povzročijo resne okužbe. Preživijo lahko tako v krvnem obtoku gostitelja kot tudi v okolju z nizkim dotokom določenih hranil. Prav tako se lahko uspešno izognejo imunskemu sistemu in preživijo protimikrobne ukrepe, ki se jih poslužujemo v bolnišnicah. *S. aureus* med drugim lahko povzroča ture, impetigo bullosa, okužbe kirurških ran, vnetje mišic, botriomiokozo, akutni endokarditis, gnojno vnetje ovojnic hrbtenjače, sindrom toksičnega šoka in stafilokokni eksfoliativni dermatitis in druga bolezenska stanja. *S. aureus* je opremljen z ogromnim arzenalom različnih virulenčnih faktorjev in drugih proteinov, ki povečajo njegovo spodobnost preživetja znotraj gostitelja, zato predstavlja enega najnevarnejših patogenih organizmov tako v bolnišnicah, kot tudi v naravnem okolju. Sposobnost tvorbe biofilmov njegovo odpornost le še poveča. Biofilm je skupnost mikroorganizmov, ki se pritrdi na površino in ima pomembno vlogo pri preživetju patogenov tako v telesu kot zunaj v okolju. Poleg tega so bakterije znotraj biofilma v primerjavi s posameznimi bakterijami odporne na precej višje koncentracije antibiotikov. Razširjena uporaba antibiotikov v preteklih desetletjih je povzročila pojavljanje in širjenje proti antibiotikom odpornih sevov *S. aureus*, kot sta MRSA (*S. aureus*, odporen proti meticilinu) in VRSA (*S. aureus*, odporen proti vankomicinu). Pred 90. leti preteklega stoletja je bila MRSA zgolj bolnišnična okužba, danes pa je predvsem v

razvitem svetu razširjena tudi izven bolnišnic. Izolirani pa so bili že tudi sevi *S. aureus*, odporni proti večini znanih antibiotikov.

Ker nam grozi pojavljanje še bolj odpornih sevov bakterij *S. aureus*, je razvoj novih antibiotikov še toliko bolj pomemben. Sinteza peptidoglikana je bila tarča za zdravljenje bakterijskih infekcij pri ljudeh in živalih skoraj stoletje in tako so bakterije razvile številne obrambne mehanizme. Ker je peptidoglikanska celična stena prisotna samo pri bakterijskih celicah, bi lahko bili encimi, ki jo razgrajujejo, primerne nove tarče. Zato bomo v predlaganem projektu preučili N-acetilglukozaminidaze (v nadaljevanju glukozaminidaze) iz družine glikozil hidrolaz 73 (GH73) ter njihov tarčni potencial za razvoj novih, specifično delujočih zdravil. Lokalizirane so na zunanji površini bakterije in tako lahko dostopne za zdravila. Kaže da igrajo pomembno vlogo pri razgrajevanju celične stene.

Pri tej raziskavi nameravamo pridobiti nov vpogled v razumevanje mehanizmov, ki so odgovorni za preoblikovanje peptidoglikana in biofilmov bakterije *S. aureus*. V *E. coli* bomo pripravili in očistili vseh glikozid hidrolaze iz seva *S. aureus* Mu50 v zadostnih količinah za predlagane študije. Okarakterizirali bomo njihovo aktivnost, določili njihove tridimenzionalne strukture proteinov in identificirali njihove skupne strukturne značilnosti. Preučili bomo vlogo aminokislinskih ostankov, ki so udeleženi pri katalizi in pri vezavi substrata. Z uporabo virtualnega rešetanja bomo načrtovali potencialne inhibitorje in ligande. Identificirane inhibitorje bomo nato sintetizirali in ocenili njihov potencial in vitro ter in vivo na bakterijskih kulturah. Nato bomo poskusili tudi določiti strukture proteinov z vezanimi inhibitorji. Z uporabo in silico metod in eksperimentalnih podatkov bomo poskusili dobiti vpogled v mehanizem njihovega encimskega delovanja. Skušali bomo tudi določiti njihovo vlogo pri delitvi celic in nastanku biofilma.

### Faza projekta

Prve tri faze projekta so že skoraj zaključene in zadnji dve fazi sta v teku.

### Bibliografske reference

BORIŠEK, Jure, PINTAR, Sara, OGRIZEK, Mitja, TURK, Dušan, PERDIH, Andrej, NOVIČ, Marjana. A water-assisted catalytic mechanism in glycoside hydrolases demonstrated on the *Staphylococcus aureus* autolysin E. *ACS catalysis*, ISSN 2155-5435, 2018, vol. 8, no. 5, str. 4334-4345, doi: [10.1021/acscatal.8b01064](https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01064).

BORIŠEK, Jure, PINTAR, Sara, OGRIZEK, Mitja, GOLIČ GRDADOLNIK, Simona, HODNIK, Vesna, TURK, Dušan, PERDIH, Andrej, NOVIČ, Marjana. Discovery of (phenylureido)piperidiny l benzamides as prospective inhibitors of bacterial autolysin E from *Staphylococcus aureus*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, ISSN 1475-6366, 2018, vol. 33, no. 1, str. 1239-1247, doi: [10.1080/14756366.2018.1493474](https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1493474).