

Wydział Biologii

Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Karolina Ciemińska

Molekularny mechanizm stabilności
termicznej endolizyny Ts2631 bakteriofaga
vB_Tsc2631 infekującego *Thermus*
scotoductus

Molecular mechanism of thermal stability of the
endolysin Ts2631 from bacteriophage vB_Tsc2631
infecting *Thermus scotoductus*

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

celem uzyskania stopnia doktora

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: dr hab. Magdalena Płotka, prof. UG

Katedra Mikrobiologii

Gdańsk 2026

W pierwszej kolejności pragnę podziękować mojej Promotor, dr hab. Magdalenie Płotce, Prof. UG, która mi zaufała i przyjęła pod swoje skrzydła poświęcając czas, uwagę, wiedzę, wyrozumiałość i nieocenioną pomoc – bez której nie byłoby mnie w tej pracy.

Dziękuję mojemu Narzeczonemu, za wsparcie, cierpliwość i pomoc. Za to, że jest ze mną przez całą tę drogę.

Wszystkim zaangażowanym w pracę, którzy mnie wspierali zarówno merytorycznie, jak i duchowo także pragnę podziękować.

Rodzicom, Rodzeństwu i najbliższym, którzy towarzyszą mi w wszystkich działaniach – dziękuję.

Część wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej została przedstawiona w poniższej pracy:

Cieminska, K., Kaczorowska, A-K., Kozłowski, P. L., Gorniak, M., Fridjonsson, O., Hreggvidsson, G., Kaczorowski, T., Plotka, M. (2026). Residue-level determinants of thermal stability of the extremophilic Ts2631 endolysin” Scientific Reports; <https://doi.org/10.1038/s41598-026-38786-z>

Pozostały dorobek publikacyjny:

1. Kocot, A., Swebocki, T., Ciemińska, K., Łupkowska, A., Kapusta, M., Grimon, D., Laskowska, E., Kaczorowska, A-K., Kaczorowski, T., Boukherroub, R., Briers, Y., & Płotka, M. (2025). Deep eutectic solvent enhances antibacterial activity of a modular lytic enzyme against *Acinetobacter baumannii*. Scientific Reports, 15, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80440-z>
2. Swebocki, T., Kocot, A., Ciemińska, K., Bortolus, C., Muchembled, J., Mechouche, M. S., Jacquin, J., Haddadi, K., Siah, A., Sendid, B., Boukherroub, R., & Płotka, M. (2025). Breaking through Microbial Defenses - Organic Acid-Based Deep Eutectic Solvents as a Neoteric Strategy in Bacterial Biofilms, Persister, and Fungal Control. ACS Applied Bio Materials, 8, Article 10. <https://doi.org/10.1021/acsabm.5c01159>
3. Kosznik-Kwaśnicka, K., Podlacha, M., Grabowski, Ł., Stasiłojć, M., Nowak-Zaleska, A., Ciemińska, K., Cyske, Z., Dydecka, A., Gaffke, L., Mantej, J., Myślińska, D., Necel, A., Pierzynowska, K., Piotrowska, E., Radzanowska-Alenowicz, E., Rintz, E., Sitko, K., Topka-Bielecka, G., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2022). Biological aspects of phage therapy versus antibiotics against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chickens. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941867>
4. Kosznik-Kwaśnicka, K., Ciemińska, K., Grabski, M., Grabowski, Ł., Gorniak, M., Jurczak-Kurek, A., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2020). Characteristics of a series of three bacteriophages infecting *Salmonella enterica* strains. International Journal of Molecular Sciences, 21, Article 17. <https://doi.org/10.3390/ijms21176152>

Badania naukowe prowadziłam we współpracy z krajowymi ośrodkami naukowymi:

- Kolekcja Plazmidów i Drobnoustrojów, Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański – analiza nanoDSF wariantów endolizyny Ts2631 oraz wariantów endolizyny K11gp3.5 – dr n. med. Anna-Karina Kaczorowska
- Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki, Uniwersytet Warszawski – pomoc/przeszkolenie oraz udział w analizie bioinformatycznej – dr hab. Łukasz Paweł Kozłowski
- Pracownia Genetyki, Katedra Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański – analiza filogenetyczna – dr hab. Marcin Górniak
- Sekcja Pomiarów Fizyko-Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański – pomiary spektropolarymetryczne (dichroizm kołowy) – dr Danuta Augustin-Nowacka

Badania naukowe zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki oraz Uniwersytet Gdański

- OPUS 20 nr 2020/39/B/NZ6/00589 „Analiza molekularna stabilności termicznej endolizyn z ekstremofilnych bakteriofagów na drodze zwalczania bakterii Gram-ujemnych”, przyznany dr hab. Magdalenie Płotce, prof. UG
- Młody Naukowiec 2022 (539-D100-B957-22) „Molekularny mechanizm wiązania substratu endolizyny Ts2631”, przyznany mgr Karolinie Ciemińskiej
- Młody Naukowiec 2024 (539-D100-B168-24) „Trójwymiarowe modele białek będących strukturalnymi homologami endolizyny Ts2631 oraz analiza funkcjonalna rekombinowanych enzymów i ich wariantów substytucyjnych” przyznany Karolinie Ciemińskiej
- Urządzenie Prometheus NT.48 AGOHTU użyte w tej pracy zostało sfinansowane z dotacji na sprzęt inwestycyjny przyznanej przez Ministerstwo Edukacji Narodowej i Nauki (A/SP/453344/2020) dr n. med. Annie-Karinie Kaczorowskiej

Przyznana nagroda:

Wyróżnienie za najlepsze wystąpienie ustne pt.: „Molekularne podstawy termostabilności endolizyny Ts2631 z bakteriofaga vB_Tsc2631 - rola wybranych aminokwasów w stabilności i aktywności enzymu” podczas IV Sympozjum Bakteriofagowego, 4-6 września 2025, Gdańsk, Polska

Przyznany patent:

Agata Jurczak-Kurek, **Karolina Ciemińska**, Katarzyna Kosznik-Kwaśnicka, Łukasz Grabowski, Alicja Węgrzyn, Grzegorz “Szczep bakteriofaga oraz zastosowanie szczepu bakteriofaga w przemyśle spożywczym lub w hodowli zwierząt specyficzny wobec bakterii należących do rodzaju *Salmonella* oraz jako środek do zwalczania bakterii z gatunku *Salmonella enterica*”, numer zgłoszenia: 433077, numer patentu: 240907, Kraj zgłoszenia: Polska

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	11
Streszczenie	13
Abstract	14
1. Wstęp	15
1.1 Lekooporność bakterii	16
1.2 Nowe strategie w zwalczaniu patogenów bakteryjnych.....	18
1.2.1 Przeciwciała monoklonalne.....	18
1.2.2 Peptydy antymikrobiologiczne	18
1.2.3 Nanocząstki	19
1.2.4 Terapia fotodynamiczna	19
1.2.5 Probiotyki	20
1.2.6 Fagoterapia	21
1.2.7 Terapia przeciw czynnikom wirulencji	22
1.2.8 Opracowanie nowych związków o aktywności przeciwbakteryjnej.....	23
1.2.9 Peptydoglikan jako potencjalny cel terapeutyczny	24
1.2.10 Enzybiotyki	25
1.3 Endolizyny	26
1.4 Autolizyny	28
1.5 Przykłady badań klinicznych.....	31
1.6 Istotne cechy leków przeciwbakteryjnych	32
1.7 Znaczenie stabilności termicznej	32
1.8 Elementy istotne w stabilności termicznej białek	34
1.9 Organizmy termofilne źródłem enzymów	37
1.10 Endolizyna Ts2631	38
2. Cel pracy	40
3. Materiały	41

3.1	Szczepy bakteryjne.....	41
3.2	Plazmidy.....	41
3.3	Sekwencje nukleotydowe białek, których synteza została zamówiona w firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Germany).....	41
3.4	Startery do mutagenyzy miejscowo-specyficznej	46
3.5	Antybiotyki.....	50
3.6	Podłoża mikrobiologiczne.....	50
3.7	Bufory oraz roztwory	52
3.8	Żele do elektroforezy	57
3.9	Pozostałe odczynniki.....	58
4.	Metody	60
4.1	Metody bioinformatyczne	60
4.2	Filogeneza	60
4.3	Modelowanie białek	60
4.4	Określenie i normalizacja czynnika B.....	61
4.5	Analiza statystyczna	62
4.6	Mutagenyza miejscowo-specyficzna i synteza genów	62
4.7	Elektroforeza w żelu agarozowym.....	62
4.8	Przygotowanie komórek super-kompetentnych	63
4.9	Przygotowanie komórek kompetentnych	63
4.10	Transformacja chemiczna.....	63
4.11	Nadprodukcja i oczyszczanie	64
4.12	Sączenie molekularne (SM)	64
4.13	Metoda Bradford do oznaczenia stężenia białek.....	65
4.14	Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	65
4.15	Aktywność lityczna białek	66
4.15.1	Przygotowanie substratów.....	66

4.15.2	Test redukcji zmętnienia.....	66
4.15.3	Określanie optymalnych warunków dla aktywności litycznej białek	67
4.15.4	Określenie spektrum działania białek	67
4.16	Nano różnicowa fluorymetria skaningowa (nanoDSF).....	68
4.17	Izolacja Peptydoglikanu	68
4.18	Test wiązania peptydoglikanu	69
4.19	Spektroskopia dichroizmu kołowego	70
5.	Wyniki i dyskusja.....	70
5.1	Analiza filogenetyczna endolizyny Ts2631.....	70
5.2	Analiza porównawcza endolizyny Ts2631 oraz lizozymu faga T7.....	72
5.2.1	Występowanie aminokwasów aromatycznych.....	76
5.2.2	Występowanie prolin.....	78
5.2.3	Występowanie dodatnio naładowanych aminokwasów	78
5.2.4	Występowanie ujemnie naładowanych aminokwasów	79
5.2.5	Występowanie seryny.....	79
5.2.6	Porównanie występowania aminokwasów między termofilnymi endolizynami a lizozymem T7.....	80
5.2.7	Porównanie występowania aminokwasów między endolizyną Ts2631, lizozymem T7 a białkami wirusowymi i bakteryjnymi.....	80
5.3	Mutagenesa miejscowo-specyficzna.....	82
5.4	Nadprodukcja i oczyszczanie endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów	84
5.5	Pomiar aktywności i temperatury topnienia endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów... ..	85
5.5.1	Reszty konserwowane i centrum katalitycznego.....	87
5.5.2	Warianty prolinowe	91
5.5.3	Warianty tryptofanowe	93
5.5.4	Warianty argininowe	95
5.6	Test wiązania peptydoglikanu	99
5.7	Podsumowanie analizy termostabilności endolizyny Ts2631	101

5.8	Poszukiwanie strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 o pochodzeniu mezofilnym.....	103
5.9	Endolizyna K11gp3.5.....	106
5.9.1	Nadprodukcja i oczyszczanie białka	106
5.9.2	Testy aktywności.....	107
5.9.2.1	Test aktywności endolizyny K11gp3.5.....	108
5.9.3	Porównanie sekwencji endolizyn Ts2631 i K11gp3.5.....	109
5.9.4	Nadprodukcja i oczyszczanie wariantu endolizyny K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W.....	109
5.9.5	Analiza aktywności wariantu endolizyny K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W...	111
5.9.6	Trójwymiarowy model endolizyny K11gp3.5.....	111
5.9.7	Nadprodukcja i oczyszczanie K11gp3.5_N91W_Q137W oraz K11gp3.5_F96W_L136W.....	113
5.9.8	Analiza aktywności i temperatury topnienia endolizyny K11gp3.5 oraz jej wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W.....	115
5.10	LytO.....	119
5.10.1	Analiza bioinformatyczna białka LytO	119
5.10.2	Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka LytO	123
5.10.3	Testy aktywności autolizyny LytO	124
5.10.4	Analiza pojedynczej domeny amidazy oraz jej wariantu.....	127
5.10.5	Testy aktywności domeny amidazy białka LytO o raz jej wariantu Q115W_F179W 128	
5.11	Pozostałe białka.....	130
5.11.1	O3I_029140.....	130
5.11.2	LytA_27.....	134
5.11.2.1	Analiza bioinformatyczna	134
5.11.2.2	Nadprodukcja i oczyszczanie białka	137
5.11.2.3	Charakterystyka funkcjonalna białka LytA_27.....	141

5.11.2.4	Mutageneza miejscowo-specyficzna, nadprodukcja i oczyszczanie LytA_27-M487W_Y492W	144
5.11.2.5	Określenie T_m białka LytA_27 i wariantu LytA_27_M487W_Y492W	145
5.11.3	Lyc2	146
5.11.3.1	Analiza bioinformatyczna	146
5.11.3.2	Oczyszczanie białka	150
5.11.3.3	Charakterystyka funkcjonalna białka Lyc2	150
5.11.4	Mutageneza miejscowo specyficzna Lyc2	155
5.12	Podsumowanie analizy dotyczącej strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 .	156
6.	Wnioski	157
7.	Literatura	160
8.	Suplement	184
9.	Spis Tabel i Rycin	192

Wykaz stosowanych skrótów

3D - trójwymiarowy

Aa – aminokwasy

AMP – peptydy antymikrobiologiczne

AMR – *ang. Antimicrobial Resistance*, antybiotykooporność

API – Interfejs Programowania Aplikacji

APS – siarczan amonu

ATP - adenozyntrifosforan

BSA – *ang. Bovine Albumin Serum*, albumina bydlęca

CA – anhydraza węglanowa

CHAP - cysteino/histydyno zależna aminohydrolaza/peptydaza

DES – *ang. Deep Euectic Solvents*, Ciecze Głęboko Eutektyczne

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DUF – *ang. Domain of Unknown Function*, Domena o Nieznanej Funkcji

FDA – *ang. Federal Drug Administration*, Federalna Agencja Leków

FGF7 – *ang. Fibroblast Growth factor 7*, 7 Czynn timerostu Fibroblastów

IARC – *ang. International Agency for Research on Cancer*, Międzynarodowa Agencja Badań nad Nowotworami

IPTG - izopropylotiogalaktopiranozyd

KM – Katedra Mikrobiologii

KPD – Kolekcja Plazmidów i Drobnoustrojów

LPS – lipopolisacharyd

MRSA - *ang. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus oporny na metycylinę*

OD₆₀₀ – Gęstość optyczna mierzona przy długości fali 600 nm

OmpW – *ang. outer membrane protein W*, białko porynowe W

PBP – *and. Peptidoglycan Binding Protein*, Białka Wiążące Peptydoglikan

PCR – *ang. Polymerase Chain Reaction*, łańcuchowa reakcja polimerazy

PGRP – *ang. Peptidoglycan Recognition Protein*, Białka Rozpoznające Peptydoglikan

PGN -peptydoglikan

pSSdp – Protein Secondary Structure Database

PZ – pary zasad

RMSD – *ang. Root Mean Square Deviation*, średniokwadratowe odchylenie

RMSF - *ang. Root Mean Square Fluctuation*, fluktuacja średniokwadratowa

QS – *ang. quorum sensing*, wyczuwanie liczebności

SDS-PAGE – Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem dodecylsulfianu sodu

SH3 - bakteryjny homolog Src 3

TDTF – Fluorescencji Przejściowej Denaturacji Chemicznej (*ang. Thermal Denaturation Transmition Fluorescence* –)

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina

TM-score – template modelling score

TRZ – test redukcji zmętnienia

UG – Uniwersytet Gdański

UV – Ultrafiolet

VP-DSC (*ang. Variable Pressure Differential Scanning Calorimetry*)

WHO – *ang. World Health Organisation*, Światowa Organizacja Zdrowia

Streszczenie

Walka ludzi z patogenami trwa od wielu wieków. Odkrycie antybiotyków i bakteriofagów przyczyniło się do poprawy jakości życia, jednak każdy organizm, w tym bakterie, wykształca mechanizmy przetrwania. Ludzkość coraz bardziej doświadcza kryzysu związanego z lekoopornością bakterii. Dlatego wyznaczenie nowych strategii w ich zwalczaniu jest tak potrzebne. Jedną z pożądanych cech odpowiedniego leku jest jego stabilność. Dlatego enzymów bakteriolytycznych warto szukać w organizmach termostabilnych, które cechują się wysoką opornością na denaturację chemiczną, czy proteolizę. W bieżącej pracy zbadałam mechanizm stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Temperatura topnienia (T_m) tego białka wyznaczona w buforze 20 mM MES pH 6,0 wynosiła 99,82°C, jednak w buforze składającym się z 20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl i 10% glicerolu została określona na 104,73°C. W wyniku przeprowadzonych analiz dowiodłam, że reszty W102, W109, W145 i P140 są istotne dla stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Poza tym zaburzenie koordynacji Zn^{2+} skutkowało znacznym obniżeniem temperatury topnienia (T_m). W trakcie badań wykazałam także, że inne białka pochodzące z termofili podobne do Ts2631 posiadają tryptofany oraz prolinę w tej samej pozycji, co sugeruje że mechanizm stabilności termicznej może być podobny u tych białek. Postawiłam sobie za cel sprawdzenie, czy można podnieść stabilność termiczną białek mezofilnych o strukturalnej homologii do endolizyny Ts2631 bez wpływu na ich aktywność lityczną, poprzez zamianę aminokwasów w białku mezofilnym na te, które odpowiadają za stabilność termiczną endolizyny Ts2631. Przebadałam endolizynę K11gp3.5 pochodzącą z bakteriofaga K11, który infekuje *Klebsiella pneumoniae* oraz domenę amidazową białka LytO, która pochodzi z *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325. W przypadku wariantu N91W_Q137W endolizyny K11gp3.5, T_m uległa zmniejszeniu o około 6°C. W przypadku wariantu substytucyjnego Q115W_F179W domeny amidazowej białka LytO T_m udało się podnieść o 9,7°C w porównaniu do białka typu dzikiego. Uzyskane wyniki pokazują, że samo podstawienie reszt aminokwasowych nie wystarczy, aby poprawić stabilność termiczną białka, a potrzebna jest jeszcze analiza otoczenia reszt, które chce się zamienić. Nie ma zatem uniwersalnej procedury badawczej, a każdy przypadek wymaga indywidualnej analizy.

Abstract

People have been fighting pathogens for centuries. The discovery of antibiotics and bacteriophages has contributed to improving the quality of life, but every organism, including bacteria, develops survival mechanisms. Humanity is increasingly experiencing a crisis related to bacterial drug resistance. That is why it is so necessary to develop new strategies to combat it. One of the desirable characteristics of a suitable drug is its stability. Therefore, bacteriolytic enzymes should be sought in the thermostable organisms which are highly resistant to chemical denaturation and proteolysis. In the current study, I have investigated the mechanism of thermal stability of endolysin Ts2631 based on its amino acid sequence. The melting temperature (T_m) initially determined for this protein was 99.82°C, but in a buffer consisting of 20 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM NaCl and 10% glycerol, it was determined to be 104.73°C. As a result of my analyses, I proved that residues W102, W109, W145 and P140 are important for the thermostability of endolysin Ts2631. In addition, disruption of Zn^{2+} coordination resulted in a significant decrease in T_m . During my research, I also demonstrated that other proteins derived from thermophiles similar to the Ts2631 have the aforementioned tryptophan and proline in the same position, which suggest that the mechanism of thermal stability may be similar in these proteins. I set a goal of checking whether the thermostability of mesophilic proteins with structural homology to endolysin Ts2631 can be increased without affecting their lytic activity, after replacing the amino acids in the mesophilic proteins with those responsible for thermostability of Ts2631 endolysin. I examined K11gp3.5 endolysin derived from bacteriophage K11, which infects *Klebsiella pneumoniae* and the amidase domain of the LytO protein, which derived from *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325. In the case of the Q115W_F179W substitution variant of the protein LytO amidase domain, the T_m was increased by 9.7°C compared to the wild-type protein. In the case of N91W_Q137W variant, T_m decreased by approximately 6°C. The results obtained show that the substitution of amino acid residues alone is not sufficient to improve the thermostability of a protein, and that it is also necessary to analyse the environment of the residues to be replaced. There is therefore no universal research procedure, and each case requires individual analysis.

1. Wstęp

Ludzkość radziła sobie z patogennymi mikroorganizmami od zarania dziejów. Wiadome jest, że Egipcjanie w Starożytności używali spleśniałego chleba na infekcje ran¹. Ważnym kamieniem milowym okazało się odkrycie bakteriofagów, które jednak na długi czas odeszły w niepamięć na rzecz antybiotyków, których złota era przypada na lata 1940-1960². Gdy wydawało się, że era chorób wywoływanych przez mikroorganizmy została opanowana, rzeczywistość szybko zweryfikowała ten optymizm, ponieważ pojawiło się zjawisko oporności bakterii na antybiotyki. Problem ten narastał każdego roku, a w dniu dzisiejszym jest realnym zagrożeniem dla wielu istnień ludzkich. Występuje szereg przyczyn, dla których dzisiejszy problem lekooporności jest tak poważny, do których można zaliczyć m. in. nadużywanie antybiotyków w sytuacjach, gdy ich stosowanie nie było konieczne. Ostatecznie sprowadza się to do faktu, że mikroorganizmy wykształcają mechanizmy obronne przeciwko ich działaniu. Mogą one nabyć oporność poprzez mobilne elementy genetyczne, bądź poprzez mutacje w chromosomie¹.

W 2017 roku Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organisation, WHO*) opublikowała listę obejmującą 12 rodzin patogenów bakteryjnych (zdefiniowanych według taksonu i kluczowego mechanizmu oporności), które stanowią największe zagrożenie dla zdrowia ludzkości. W skład tych patogenów wchodzi także grupa ESKAPE, znana bardzo dobrze wszystkim mikrobiologom, której nazwa pochodzi od pierwszych liter bakterii:

- *Enterococcus faecium*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Klbesiella pneumoniae*,
- *Acinteobacter baumannii*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Enterobacter spp.*

W maju 2024 roku ta lista została uaktualniona o nowe informacje i w tym momencie obejmuje ona już 15 rodzin. Jedną z głównych motywacji, które uzasadniają skupienie się naukowców na podanym problemie jest informacja, że do 2050 roku możliwe jest osiągnięcie pułapu śmiertelności na poziomie 10 milionów osób rocznie z powodu infekcji bakteryjnych³. To tak, jakby cała populacja Londynu i Warszawy miała zniknąć w ciągu jednego roku. Obecnie taki poziom śmiertelności dotyczy osób chorujących na nowotwory. W 2022 roku według danych podanych przez Międzynarodową Agencję Badań nad Nowotworami (*ang.*

International Agency for Research on Cancer - IARC) 9,7 mln pacjentów zmarło w skutek choroby nowotworowej⁴. Wzrastająca lekooporność wśród bakterii to nie tylko zwiększona ilość zgonów, ale także zwielokrotnione koszty opieki zdrowotnej, które globalnie mogą wynieść około 1 biliona dolarów rocznie³. Trzeba zaznaczyć, że dotyczy to nie tylko zdrowia ludzi, ale także hodowli zwierząt, czy całego sektora spożywczego. Dlatego naukowcy skupiają się obecnie na poszukiwaniu alternatywnych metod zwalczania patogenów.

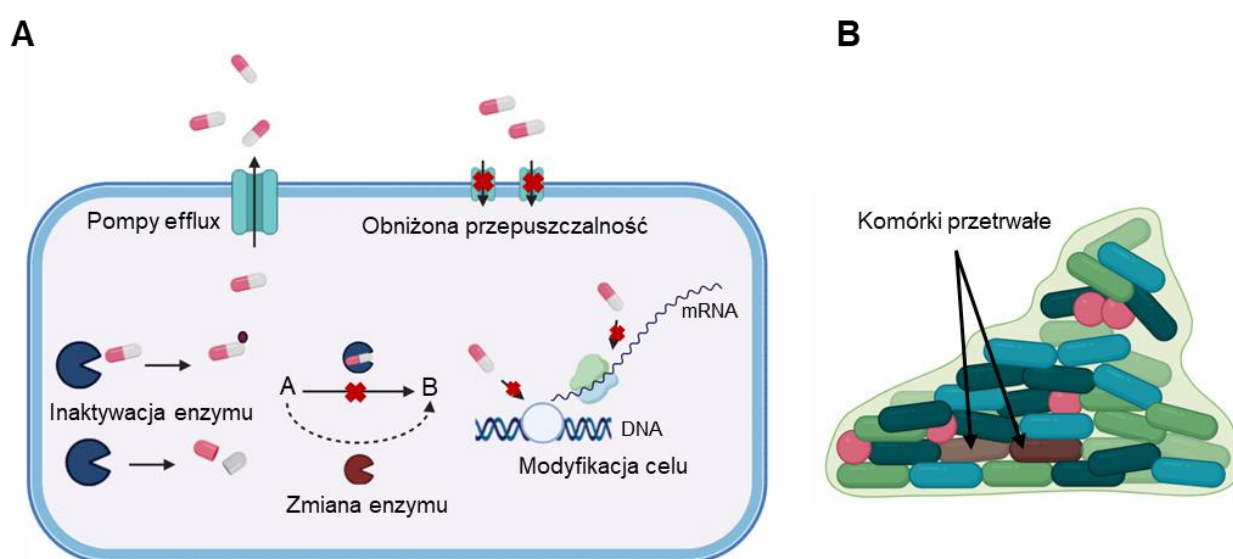
1.1 Lekooporność bakterii

Bakterie wykształciły wiele mechanizmów oporności, które rozprzestrzeniają się na drodze horyzontalnego transferu genów, jak i obejmują mutacje w obrębie chromosomu.

Mechanizmy oporności bakterii (Ryc. 1) można podzielić na:

- Zredukowaną akumulację antybiotyków:
 - Obniżoną penetracją antybiotyków przez mutacje w białkach porynowych, które znajdują się w błonie zewnętrznej komórek Gram-ujemnych, np. zmodyfikowane poryny OmpK36 powodują zmniejszoną przepuszczalność dla niektórych antybiotyków β -laktamowych u *Klebsiella pneumoniae*^{5,6}.
 - Obecność pomp efflux, które aktywnie wypompowują antybiotyki z komórki bakteryjnej pozbywając się zagrożenia. Mogą one być kodowane na chromosomie, albo na plazmidach. Obecność pompy AcrAB w połączeniu z obniżoną ekspresją poryn powoduje u *Klebsiella aerogenes* (dawniej *Enterobacter aerogenes*) oporność na imipenem. Obecność pomp MsrA i MsrC skutkuje opornością na makrolidy bakterii Gram-dodatnich^{7,8}.
- Enzymatyczne modyfikacje antybiotyku – modyfikacje dotyczą acetylacji, fosforylacji, czy adenylacji. Dochodzi do zmiany konformacji antybiotyku, który nie jest w stanie efektywnie oddziaływać ze swoim celem.
 - Powszechne są enzymy modyfikujące aminoglikozydy. Na przykład enzymy z rodziny APH(3) często występują u Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii powodując modyfikacje kanamycyny, czy streptomycyny^{9,10}.

- Inne szeroko rozpowszechnione enzymy to enzymy inaktywujące β -laktamy, np. β -laktamazy klasy A według schematu Amblera^{10,11} znajdujących w patogenach z grupy ESKAPE⁹.
- Modyfikacja miejsca docelowego w bakterii, czyli inaczej ominięcie celu polega na stworzeniu alternatywnej drogi, która poprzedni cel, w który skierowany był antybiotyk, uczyni zbędnym, albo doprowadzi do zmniejszenia jego powinowactwa z lekiem. Sztandarowym przykładem jest powstanie oporności na metycylinę u *S. aureus* (ang. Methicillin-Resistant *S. aureus*, MRSA). Metycylina to antybiotyk β -laktamowy, który wiąże się z białkiem wiążącym peptydoglikan (ang. *Peptidoglycan Binding Protein*, PBP). MRSA nabywa analog PBP2a kodowany przez gen *mecA* o niższym powinowactwie do antybiotyków β -laktamowych^{12,13}.
- Komórki przetrwałe w biofilmach, to komórki o zmienionym metabolizmie, w formie uśpienia. Sam dostęp do biofilmu jest dla antybiotyków utrudniony nawet 1000 razy bardziej, a komórki przetrwałe są odporne na ich działanie. Wynika to z samej budowy biofilmu, utrudnionej dyfuzji antybiotyków i nierównomiernego rozmieszczenia substancji bakteriobójczej. W wyniku stresu dochodzi do indukcji odpowiedzi adaptacyjnych, a w biofilmach wielogatunkowych dodatkowo dochodzi do wzajemnego wspierania się bakterii. Zdolność do wytwarzania biofilmu jest cechą wielu bakterii, w tym tych z grupy ESKAPE¹⁴⁻¹⁶.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie niektórych mechanizmów oporności bakterii. A – enzymy, które produkuje bakterie doprowadzają do inaktywacji, bądź zmniejszonego działania leku. Pompy efflux odpowiadają

za transport leków poza komórkę; poryny odpowiadają za zmniejszoną przepuszczalność substancji; dochodzi do inaktywacji leku poprzez jego degradację, bądź modyfikację; powstaje alternatywna ścieżka metaboliczna, która zastępuje szlak, na jaki był skierowany lek; modyfikacja miejsca wiązania antybiotyku z celem obniżenia powinowactwa. **B** – Schemat biofilmu bakteryjnego, w którym znajdują się komórki przetrwałe odporne na działanie antybiotyków (rycina inspirowana¹⁷).

1.2 Nowe strategie w zwalczaniu patogenów bakteryjnych

Dziś próbuje się wykorzystać wszelkie możliwe metody do walki z antybiotykoopornością (*ang. Antimicrobial Resistance, AMR*). Stosuje się mieszanie ze sobą antybiotyków o różnym działaniu, a w niektórych ośrodkach możliwe jest już wykorzystanie bakteriofagów. Poniżej zostaną opisane wiodące strategie w zwalczaniu patogenów, które skupiają się głównie na wykorzystaniu ich w medycynie i weterynarii, choć wiele może mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym, czy w rolnictwie. Istnieje szereg innych metod, jak choćby wykorzystanie cieczy głęboko eutektycznych (*ang. Deep Eutectic Solvents, DES*), które ze względu na toksyczność¹⁸ raczej nie znajdą zastosowania w leczeniu pacjentów. Wiele z nich (te, które nie są oparte o ChCl) jest przykładem efektywnych i bardziej ekologicznych środków, które są w stanie niszczyć nawet komórki przetrwałe^{19,20} i wydają się lepsze niż dziś stosowane, jak np. octan etylu^{21,22}.

1.2.1 Przeciwciała monoklonalne

Przed erą antybiotyków popularna była terapia surowicą. Pozyskiwano przeciwciała z osocza osoby, która przechorowała określoną infekcję, a następnie podawano je osobie zakażonej. Przeciwciała monoklonalne są specyficzne wobec patogenu, więc wykorzystanie ich nie niszczy populacji mikrobioty naturalnie występującej w organizmie. Jest to jednak kosztowna terapia, w której nadal pojawiają się działania niepożądane²³.

1.2.2 Peptydy antymikrobiologiczne

Peptydy antymikrobiologiczne (AMP) to krótkie peptydy składające się zwykle z 8 – 50 aminokwasów (aa). Działają one na błony bakteryjne, albo wewnątrzkomórkowe składniki powodując zwiększenie przepuszczalności błony. Mogą także działać na lipopolisacharyd (LPS) doprowadzając do jego rozpadu²³. Gramicydyna i tyrocydyna, to przykłady naturalnie występujących peptydów, które są wykorzystywane od lat jako antybiotyki. Otrzymać je można z bakterii *Bacillus brevis*, a produkowane są przez tę bakterię podczas sporulacji^{23,24}. Znajduje się także inne peptydy, np. ukryte w sekwencjach endolizyn, czego przykładem jest peptyd RAP-29 obecny w sekwencji endolizyny PhiKo²⁵. Znajduje się je także zakodowane w białkach

osocza, czynnikach krzepnięcia krwi, czy hormonach diuretycznych²³, np. SCUB1-SKE25 i SCUB-MLP22²⁶.

Rozpatruje się je jako ciekawą alternatywę dla antybiotyków ze względu na ich dość szerokie spektrum działania, szybką reakcję i niewielki wpływ na powstawanie mechanizmów oporności. Niestety w płynach ustrojowych często ulegają proteolizie, co zaburza ich stabilność i przez to nie są tak skuteczne. Inną wadą jest to, że często są toksyczne dla komórek, a koszt produkcji jest relatywnie wysoki²³.

1.2.3 Nanocząstki

Nanocząstki mają wielkość od 1 do 100 nm. Dzięki temu, że są tak małe mogą dostać się do wnętrza komórki eukariotycznej i tam zadziałać na patogen bakteryjny²³. Taka funkcja jest istotna, ponieważ bakterie, jak np. *S. aureus* potrafią przetrwać w makrofagach²⁷. Kilka rodzajów nanocząstek, jak np. złota, srebra, czy tlenku cynku są badane pod kątem likwidacji drobnoustrojów²³. Jedna z grup badawczych zastosowała nowatorskie podejście do ekologicznej syntezy nanocząstek, gdzie wykorzystwała trans-aldehyd cynamonowy, jako substrat do produkcji nanomateriału, który także posiada potencjał antybakteryjny. Produkcja nanocząstek wymaga podejścia, które zagwarantuje odpowiednie właściwości nanocząstek, takich jak: rozmiar, kształt, stabilność i bioaktywność. Potrzebna jest taka metoda, którą można zastosować na skalę przemysłową. Wykorzystanie ekologicznej metody do produkcji nanocząstek ma na celu minimalizację stosowania niebezpiecznych związków chemicznych i energochłonnych procedur związanych z dotychczasowymi metodami syntezy nanocząstek. Ekologiczne metody na dzień dzisiejszy obarczone są często niską wydajnością, czy skomplikowanymi procedurami. Dlatego właśnie wykorzystanie trans-aldehydu cynamonowego jest tak przełomowe. Badacze sprawdzili między innymi działanie nanocząstek z trans-aldehydem cynamonowym na hamowanie biofilmu w cewnikach, gdzie jego inhibicja była niezwykle skuteczna, a mechanizmem, który za tym stoi jest chelatowanie jonów żelaza²⁸.

Ponadto nanocząstki są dość stabilne w płynach ustrojowych, wykazują niskie prawdopodobieństwo pojawienia się oporności u patogenu a także dzięki kontrolowanemu podaniu minimalizuje skutki uboczne u pacjenta. Nadal jednak potrzebne są badania dotyczące długotrwałego stosowania nanocząstek u ludzi, a także poprawa profili farmakokinetycznych²³.

1.2.4 Terapia fotodynamiczna

Terapia fotodynamiczna kojarzona jest przede wszystkim z leczeniem nowotworów. Dochodzi w niej do wytworzenia wolnych rodników, które doprowadzają do degradacji

komórki. W przypadku mikroorganizmów i stosowania tej terapii obserwowano powstawanie oporności, ale bardzo rzadko²⁹. Terapię fotodynamiczną próbowano wykorzystać w przypadku leczenia Covid 19, w początkowych stadiach choroby u pacjentów z różnym nasileniem objawów. Do opisanego badania zakwalifikowano 13 kobiet oraz 7 mężczyzn, a do grupy kontrolnej zakwalifikowano 12 kobiet i 8 mężczyzn, którzy otrzymali konwencjonalne leczenie na Covid-19. Wykorzystano UVA (światło niebieskie), a jako fotouczulacz zastosowano ryboflawinę. Pacjenci najpierw przyjmowali jedną kapsułkę 100 mg 5'-fosforanu ryboflawiny (dobrze rozpuszczalna forma ryboflawiny w wodzie) razem z posiłkiem. Następnie zawartość drugiej kapsułki rozpuszczali w 200 mL wody. Po upływie godziny mocowali na nadgarstku specjalnie zaprojektowane urządzenie („Spectra Watch”) z diodami, które posiadały światła o odpowiednich długościach fal i włączali je na 60 minut. Po upływie 15 minut rozpuszczoną kapsułkę z ryboflawiną umieszczano w butelce ze sprayem i pacjenci psikalili przygotowany roztwór 3-krotnie do każdego z nozdrzy. Pacjenci przepłukiwali 3-krotnie usta i gardło resztą roztworu ryboflawiny, jaka została w szklance. Rekomendowane było wypicie płynu. Po 15 minutach, pacjenci podłączali aplikator do nosa i ust do zegarka laserowego i każdą z dziurek od nosa przez 10 minut traktowali światłem niebieskim oraz UVA a następnie jamę ustną i gardło przez 20 minut. Już po 5 dniach u większości badanych pacjentów objawy ustępowały prawie całkowicie, ale u wszystkich wykazano zdecydowaną poprawę, podczas gdy w grupie kontrolnej nie zaobserwowano znaczącej poprawy³⁰.

Terapia fotodynamiczna ze względu na swoją specyfikę uważana jest za bezpieczną i nieinwazyjną, albo o minimalnej inwazyjności, dlatego rozważana jest jako jedna z potencjalnych przyszłych metod walki z lekoopornymi patogenami²⁹.

1.2.5 Probiotyki

Przez ostatnie lata wiedza na temat ludzkiej mikrobioty rozwija się bardzo dynamicznie i rośnie świadomość, jak istotną odgrywa rolę w funkcjonowaniu naszych organizmów. Probiotyki, to żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej dawce wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza. Mogą zahamować a nawet wykluczyć wzrost patogennych mikroorganizmów. Celem działania probiotyków jest ich jak najobszerniejsza kolonizacja jelita pozbawiając inne mikroorganizmy przestrzeni adhezyjnej, czy dostępności do składników odżywczych. Probiotyki są cenne też ze względu na to, że produkują bakteriocyny i stymulują układ odpornościowy. Ukazują się badania, które wskazują na to, że profilaktyczne zażywanie probiotyków u ludzi czy zwierząt redukuje ryzyko infekcji. Wskazuje się także na pozytywny wpływ probiotyków u osób z zaburzoną mikrobiotą, np. w Atopowym Zapaleniu Skóry

(AZS)³¹, łuszczycy³², u osób z depresją, chorobą Alzheimera, czy też ma pozytywny wpływ na zadania wymagające kontroli poznawczej^{33,34}. Wykazano też pozytywne działanie bakterii probiotycznych, takich jak: *Lactobacillus plantarum* Lp-115 i *L. acidophilus* NCFM na zwalczanie *Helicobacter pylori* i zmniejszenie stanu zapalnego w organizmie zainfekowanym tym patogenem³⁵.

Wciąż jednak podkreśla się istotność prowadzenia dalszych badań nad działaniem probiotyków. Potrzebna jest znajomość mechanizmów stojących za działaniem na AMR i większa wiedza na temat tego, jakie jeszcze role mikrobiota odgrywa w organizmach. Niemniej jednak wydaje się, że probiotyki odegrają istotną rolę w ludzkim życiu.

1.2.6 Fagoterapia

Pierwsze dostępne zapiski na temat bakteriofagów pochodzą z końca 19-stego wieku, chociaż oficjalnie odkrycie ich przypada na rok 1917, kiedy Felix d'Herelle podzielił się swoimi obserwacjami na forum naukowym. Fagi są wirusami infekującymi bakterie i podczas cyklu litycznego doprowadzają do lizy komórek gospodarza. Fagi potomne mogą zainfekować kolejne komórki i ten mechanizm wykorzystuje się w terapii fagowej³⁶.

Na świecie istnieje już kilka ośrodków terapii fagowej, w tym jeden w Polsce, a jest to Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu³⁷. Na świecie istnieją tylko 4 państwa, gdzie terapia jest dostępna jako alternatywa leczenia infekcji bakteryjnych obok standardowej antybiotykoterapii a są to: Gruzja, Rosja, Belgia i Portugalia³⁸. W przypadku Gruzji i Rosji procedura dostępności preparatów fagowych wygląda inaczej niż w krajach Unii Europejskiej. Niektóre z koktajli fagowych są dostępne nawet bez recepty³⁹. Należy zaznaczyć, że Ośrodek Terapii Fagowej w Gruzji, w Tbilisi sięga swoimi początkami 1923 r. i jest najstarszym ośrodkiem terapii fagowej na świecie³⁶. W pozostałych państwach, gdzie stosuje się bakteriofagi terapia ma charakter doświadczalny i jest wykorzystana jako „compassionate therapy”, kiedy nie ma już innego wyjścia, a żadne standardowe dostępne metody nie działają³⁹.

Jak dotąd nie stwierdzono negatywnych skutków terapii fagowej. Co więcej są badania, które pokazują różnice w zachowaniu u myszy po antybiotykach w przeciwieństwie do tych traktowanych fagami^{40,41}. Fagi są skuteczne w zwalczaniu biofilmów, często wykazują synergistyczne działanie z antybiotykiem⁴². Nadal prowadzi się wiele badań nad bezpieczeństwem terapii fagowej. Póki co, wyniki są obiecujące.

W przypadku fagów zastosowanie mają nie tylko całe wiriony, ale także produkowane przez nie białka, jak depolimerazy, czy endolizyny. Mówi się o nich w kontekście enzymi (szerszej grupy, do której zalicza się też enzymy o pochodzeniu innym niż bakteriofagowe). O depolimerazach wspomina się najczęściej w przypadku zwalczania biofilmów bakteryjnych, gdyż zdolne są one do degradacji egzopolisacharydu⁴³, ale są także istotne do zwalczania bakterii takich jak *K. pneumoniae*, która posiada grubą polisacharydową otoczkę⁴⁴. Z kolei endolizyny tną bakteryjny peptydoglikan i jak dotąd nie zaobserwowano, aby bakterie wykształciły jakikolwiek mechanizm oporności przeciwko tym enzymom⁴⁵, chociaż w 2024 roku ujawniono, że aktywność wobec peptydoglikanu o zwiększonej liczbie wiązań krzyżowych typu LD hamuje aktywność transglikozylaz litycznych zarówno pochodzenia bakteryjnego jak i fagowego. Badacze wykazali w doświadczeniach *in vitro*, że aktywność dwóch transglikozylaz litycznych: efektor systemu sekrecji typu VI Tse4 *A. baumannii* i endolizyny LaL (*ang. Lambda Lysozyme*) bakteriofaga Lambda spadła o około 50% po przetestowaniu ich na bardziej usieciowanym peptydoglikanie typu LD. Jednocześnie wykazano, że aktywność hydrolaz, które także tną wiązanie β -1,4-glikozydowe, nie została zahamowana. Wykonano także badania *in vivo*, w których wykazano, że zwiększenie liczby wiązań krzyżowych typu LD w komórkach *E. coli* prowadziło do ograniczonej lizy komórek bakteryjnych wywołanych tylko przez fagi, jak np. P2, które wykorzystują transglikozylazy lityczne⁴⁶.

Bakteriofagi zatem wydają się być efektywne same w sobie jako cząsteczki, ale też mogą być dawcami wielu enzymów.

1.2.7 Terapia przeciw czynnikom wirulencji

Bakterie wykorzystują wiele czynników wirulencji, które pomagają im przetrwać w danym środowisku. Wpływają one na kolonizację, inwazję immunologiczną, immunosupresję, uzyskanie pożywienia i dewastację komórek gospodarza²³.

Blokowanie tych czynników jest z jednym podejściem jakie zalicza się do terapii przeciwbakteryjnej. Takie leki oddziałują na interakcję patogenu z gospodarzem i redukują szkody, jakie bakteria wyrządza gospodarzowi. Bezlotosumab jest przykładem pierwszego czynnika, jaki został zatwierdzony w Stanach Zjednoczonych przez Federalną Agencję Leków (*ang. Federal Drug Administration – FDA*). Czynnikiem ten blokuje toksynę TcdB beztlenowej bakterii *Clostridium difficile*⁴⁷.

Taka terapia może służyć efektywnie przeciw wielolekoopornym patogenom zarówno samodzielnie, jak i w kombinacji np. z antybiotykoterapią. Mimo wielu pozytywnych aspektów terapii przeciw czynnikom wirulencji często obserwuje się wysoką toksyczność i problemy z jej wykorzystaniem w przypadku zjawiska „wyczuwania liczebności” (*ang. quorum sensing*, QS), dlatego potrzebne są kolejne badania²³.

1.2.8 Opracowanie nowych związków o aktywności przeciwbakteryjnej

W przypadku antybiotyków doszliśmy do momentu, kiedy już wydaje się niemożliwe, aby odkryć antybiotyk o nowym mechanizmie działania. W niektórych przypadkach trzeba użyć antybiotyków, które cechują się wysoką toksycznością dla ludzi. Kolistyna to peptyd o działaniu antymikrobiologicznym produkowany przez *Bacillus polymyxa*, który został odkryty w Japonii w 1949 r. Na początku lat 80 XX wieku został wycofany z użytku ze względu na swoje nefro- i neurotoksyczne działanie. Z powodu rosnącej oporności bakterii powrócono do stosowania tego antybiotyku, jako leku ostatniej szansy przeciw wielolekoopornym bakteriom Gram-ujemnym⁴⁸. W przypadku bakterii Gram-dodatnich takim lekiem jest linezolid⁴⁹, który przy długotrwałym stosowaniu (około miesiąca) może wykazać działanie neurotoksyczne⁵⁰.

Pomocną perspektywą wydaje się wykorzystanie sztucznej inteligencji w celu poszukiwania nowych leków. W taki sposób znaleziono prawdopodobnie nowy środek, który działa efektywnie przeciw *A. baumannii*, jednemu z patogenów z grupy ESKAPE. Naukowcy skupili się na białku porynowym W (*ang. outer membrane protein W* – OmpW) jako celu terapeutycznym. To białko występuje powszechnie w wielu bakteriach Gram-ujemnych, odgrywa istotną rolę w pobieraniu substancji odżywczych oraz w patogenezie bakteryjnej. W celu poszukiwania naturalnych związków działających przeciw *A. baumannii* przez hamowanie funkcji białka OmpW przeszukano bibliotekę 11 648 związków naturalnych z bazy Ambinter (<https://www.ambinter.com/>). Opracowano sztuczne modele ilościowej zależności między strukturą a aktywnością, aby przewidzieć ich aktywność biologiczną. Następnie związki, które wykazały najlepsze powinowactwo do OmpW poddano pozostałym analizom *in silico*. Ostatecznie wytypowano związek o nazwie demetyoksykurkumina, który działał najefektywniej⁵¹. Związek ten jest jednym z głównych składników kurkuminy izolowanych z *Cursumae* sp⁵². Wykazywał on działanie na wszystkie testowane szczepy *A. baumannii*, w tym odporne na kolistynę w dawce MIC 64 mg/L⁵¹.

Nadal jednak trzeba pamiętać, że wdrożenie nowego leku, takiego jak antybiotyk zajmuje nawet około 20 lat a koszt jego wdrożenia to 568 – 700 milionów dolarów. Dlatego też warte rozważenia są wszelkie alternatywne drogi walki z lekoopornymi bakteriami²³.

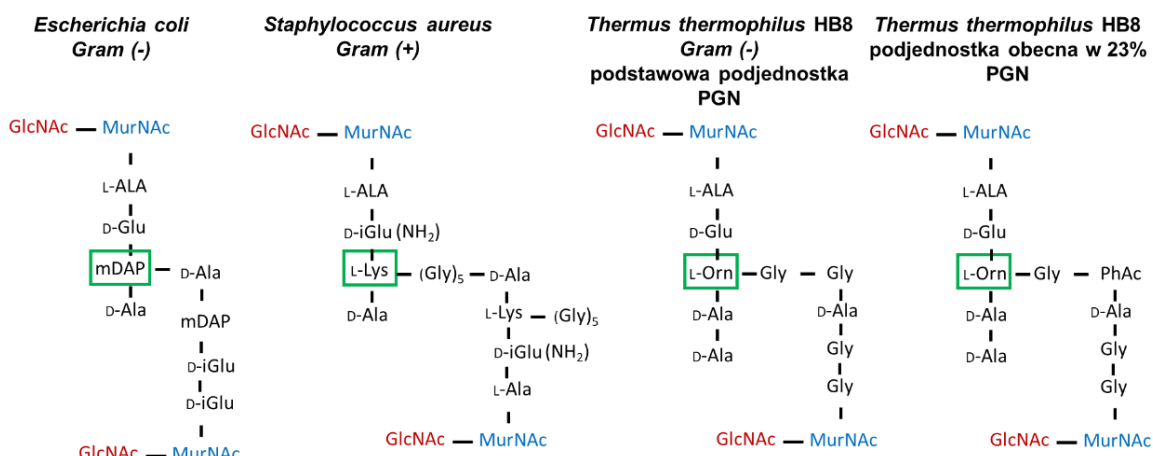
1.2.9 Peptydoglikan jako potencjalny cel terapeutyczny

Tak jak wspomniano wcześniej, warto rozdzielić poszukiwania środków przeciwdrobnoustrojowych na kilka strategicznych obszarów badawczych. Trzeba się jednak zastanowić nad potencjalnymi celami terapeutycznymi. Budowa bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich różni się od siebie. W przypadku bakterii Gram-dodatniej obecna jest gruba warstwa peptydoglikanu (PGN, 30 – 100 nm), kwas teichojowy, kwas lipoteichojowy oraz pojedyncza błona komórkowa⁵³. W budowie bakterii Gram-ujemnych wyróżnia się cienką warstwę PGN, LPS, lipoproteinę Brauna, błonę wewnętrzną i zewnętrzną⁵⁴. Rola ściany komórkowej u bakterii pełni kilka istotnych funkcji:

- chroni komórkę przed środowiskiem zewnętrznym;
- odpowiada za kształt komórki bakteryjnej;
- stanowi miejsce przyczepiania się białek, czy innych ligandów;
- odpowiada za przepuszczalność substancji, które dostają się do komórki;
- eksponuje miejsca receptorowe;
- może odpowiadać za toksyczność i wywoływanie choroby u człowieka, czy zwierzęcia.

Widoczne są na pierwszy rzut oka różnice w budowie obu typów komórek. Warto jednak przyjrzeć się bliżej strukturze peptydoglikanu. Mimo różnicy w ilości warstw sama budowa jest podobna. Peptydoglikan składa się z liniowych łańcuchów glikanowych połączonych krótkimi peptydami i otacza błonę komórkową. Łańcuchy glikanowe składają się z naprzemiennie ułożonych reszt N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Długość tego łańcucha różni się pomiędzy poszczególnymi gatunkami. Z kwasem N-acetylmuraminowym połączony jest peptyd macierzysty, do którego zwykle w trzeciej pozycji przyłączony jest poprzeczny mostek peptydowy. Skład aminokwasowy peptydu macierzystego też różni się w zależności od gatunku bakterii. Często w przypadku bakterii Gram-ujemnych mówi się o typie mDAP (od kwasu *meso*-diaminopimelinowego), a w przypadku bakterii Gram-dodatnich, typie $_L$ -Lys (od $_L$ -lizyny),

które znajdują się w trzeciej pozycji peptydu macierzystego⁵⁵. W przypadku Gram-ujemnej bakterii *Thermus*, w trzeciej pozycji występuje L-ornityna (L-Orn) (Ryc. 2).



Ryc. 2. Przykłady jednostek peptydoglikanu, jakie występują u różnych gatunków bakterii. Zielonym prostokątem oznaczono trzeci aminokwas w peptydzie macierzystym. GlcNAc – N-acetyloglukozamina; MurNAc – kwas N-acetylomuraminowy.

Struktura taka jak peptydoglikan jest silnie konserwowana i raczej nie ulega modyfikacjom. Dlatego też warto ją rozważyć jako potencjalny cel w przypadku poszukiwania leków. Peptydoglikan jest odpowiedzialny za utrzymanie kształtu komórki podczas wzrostu i podziałów w trakcie zmieniających się warunków oraz za utrzymanie ciśnienia hydrostatycznego wewnątrz komórki (turgoru). Jest on z jednej strony elastyczny a z drugiej sztywny i porowaty, co pozwala na dyfuzję małych białek. Degradacja peptydoglikanu naraża komórkę na wystawienie na stres osmotyczny, co w konsekwencji może doprowadzić do śmierci komórki bakteryjnej⁵⁵.

1.2.10 Enzybiotyki

Termin „enzybiotyki” jest połączeniem słów „enzym” i „antybiotyk”. Po raz pierwszy został użyty w kontekście endolizyn badanych przez grupę Prof. Vincenta A. Fischetti w 2001 r.⁵⁶. Teraz mówi się o nich w przypadku kilku grup enzymów, które można podzielić na⁵⁷:

- Hydrolazy peptydoglikanu pochodzenia bakteriofagowego (np. HydH5 z faga phiIPLA88⁵⁸)
- Enzymy uszkadzające biofilm:
 - pochodzenia fagowego (np. depolimeraza depoKP36 z bakteriofaga KP36⁵⁹)
 - pochodzenia bakteryjnego (np. hydrolaza PslG z *P. aeruginosa*⁶⁰)
- Autolizyny (np. LytA z *Streptococcus pneumoniae*⁶¹)
- Bakteriocyny (np. Lcn972 z *Bacillus velezensis* HN-Q-8⁶²)

- Lizozymy (np. lizozym ludzki⁶³)

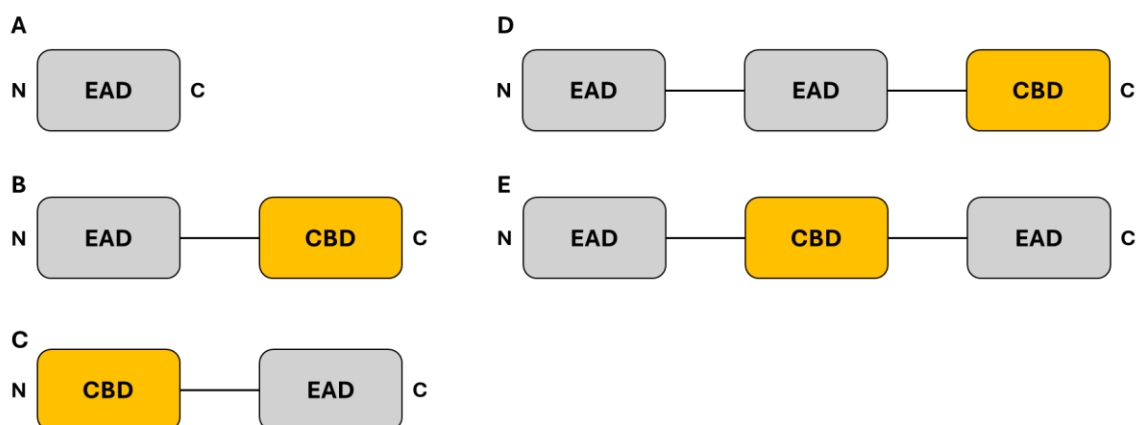
Z powodu tematyki pracy poniżej zostaną przybliżone tylko endolizyny oraz autolizyny.

1.3 Endolizyny

Endolizyny to enzymy, które produkowane są pod koniec cyklu litycznego bakteriofagów, mające za zadanie przeciąć peptydoglikan, aby uwolnić wiriony potomne z komórki gospodarza do środowiska. Termin „endolizyna” został zaprezentowany po raz pierwszy w 1958 r. przez Jacoba i Fueresa⁶⁴.

Endolizyny zbudowane są z pojedynczej domeny (białka globularne), bądź kilku domen (białka modułowe) połączonych ze sobą linkerem (Ryc. 3). Domeny te odpowiadają za funkcje katalityczne i/lub oddziaływanie z peptydoglikanem. Są one bardzo zróżnicowane i wykazują odmienny profil pod względem specyficzności substratowej⁶⁵.

Wiele endolizyn bakteriofagów infekujących bakterie Gram-ujemne posiada budowę globularną i mają od 15-20 kDa⁶⁵. Takim przykładem jest endolizyna Ph2119 pochodząca z bakteriofaga Ph2119 infekującego termofilną bakterię *Thermus scotoductus* MAT2119 o masie 17,56 kDa. Jest ona zdolna do degradacji peptydoglikanu bakterii głównie z rodzaju *Thermus*, ale też w niewielkim stopniu *E. coli* (34%) oraz *Serratia marcescens* (28%)⁶⁶. Znane są też przykłady endolizyn pochodzących z bakteriofagów infekujących bakterie o budowie modułowej. Endolizyna gp15 pochodząca z bakteriofaga AP3 infekującego *Burkholderia cenocepacia*, zbudowana jest z domeny wiążącej peptydoglikan zlokalizowanej na N-końcu białka oraz z domeny katalitycznej na jego C-końcu⁶⁷.



Ryc. 3. Przedstawienie najczęściej spotykanych konfiguracji domenowej endolizyn. **A** – budowa globularna; **B** – budowa modułowa z domeną aktywną enzymatycznie (EAD) na N-końcu i domeną wiążącą peptydoglikan (CBD) na C-końcu; **C** – budowa modułowa z CBD na N-końcu i EAD na C-końcu białka; **D** – budowa modułowa z dwoma domenami EAD i pojedynczą domeną CBD na C-końcu białka; **E** – budowa modułowa z dwiema

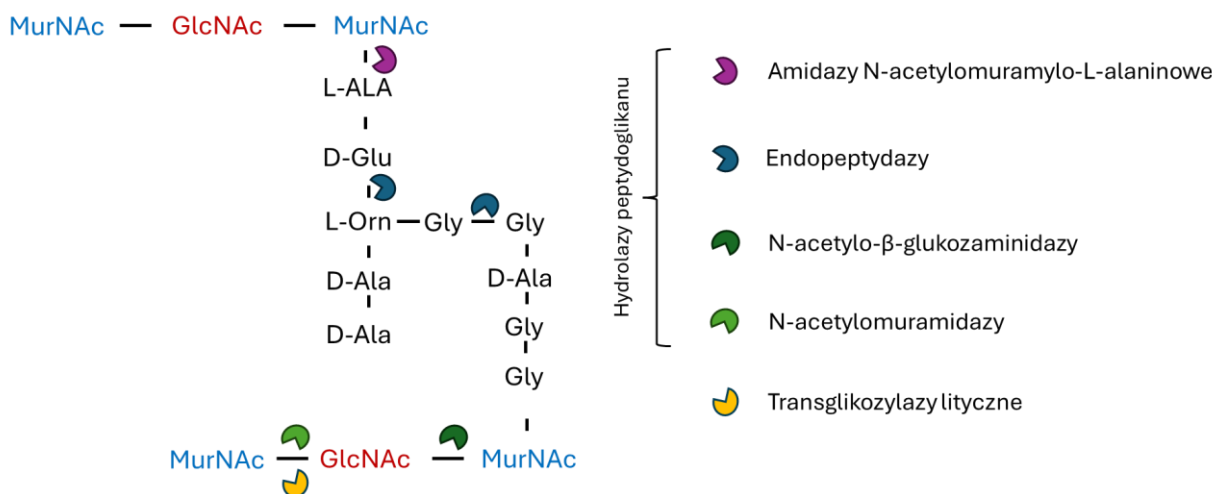
domenami EAD po obu końcach białka rozdzielonych domeną CBD. Czarne kreski pomiędzy domenami reprezentują linkery łączące ze sobą domeny.

Endolizyny fagowe mające powinowactwo do bakterii Gram-dodatnich mają z kolei w większości budowę modułową. Dwie lub więcej domen są ze sobą połączone za pomocą linkera. Większość z nich charakteryzuje się masą między 25-40 kDa⁶⁵. Przykładem takiej endolizyny może być LysGH15 pochodząca z bakteriofaga GH15 infekującego *S. aureus*. Zbudowana jest ona z trzech domen: dwóch katalitycznych (amidazy typu 2 i cysteino/histydyno zależnej aminohydrolazy/peptydazy - CHAP) oraz jednej domeny wiążącej peptydoglikan (bakteryjny homolog Src 3 - SH3b)⁶⁸. Warto wspomnieć o nietypowej endolizynie PlyC, pochodzącej z bakteriofaga C1 infekującego *Streptococcus pyogenes*. Ma ona masę 114 kDa i jest produktem dwóch genów zlokalizowanych w obrębie jednego operonu. Endolizyna zbudowana jest z 8 podjednostek PlyCB, które tworzą domenę wiążącą peptydoglikan oraz jednej podjednostki PlyCA, składającej się z dwóch domen katalitycznych (CHAP i hydrolazy glikozydowej - GyH)^{69,70}.

Wyjaśnieniem, dlaczego endolizyny rozpoznające peptydoglikan bakterii Gram-dodatnich posiadają budowę modułową, a te rozpoznające peptydoglikan bakterii Gram-ujemnych w większości jednak globularną, może być różnica w budowie ściany komórkowej tych bakterii. W przeciwieństwie do bakterii Gram-ujemnych, bakterie Gram-dodatnie nie są dodatkowo osłonięte błoną zewnętrzną. W związku z tym, jeśli endolizyny nie posiadałyby dodatkowej domeny wiążącej peptydoglikan mogłyby zostać przedwcześnie uwolnione, co prowadziłoby do lizy sąsiadujących komórek bakteryjnych. Zjawisko to, z perspektywy namnażania się bakteriofaga, byłoby niekorzystne⁷¹.

Endolizyny różnią się pomiędzy sobą miejscem działania (Ryc. 4.) i można je podzielić na 4 klasy:

- amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe;
- endopeptydazy;
- glikozydazy;
 - N-acetylo- β -glukozaminidazy;
 - N-acetylmuramidazy;
- transglikozylazy lityczne.



Ryc. 4. Schemat przedstawiający główną podjednostkę peptydoglikanu występującego u *Thermus thermophilus* HB8 z zaznaczonymi miejscami oddziaływania endolizyn fagowych. MurNac – kwas N-acetylmuraminowy; GlcNAc – N-acetyloglukozamina. Wyróżnione są 4 klasy enzymów, jakie występują u endolizyn z czego glikozydazy zostały podzielone ze względu na miejsce oddziaływania z peptydoglikanem.

Z wyłączeniem transglikozydaz litycznych, enzymy te można zaliczyć do wspólnej grupy hydrolaz peptydoglikanu. Amidazy N-acetylmuramylo-L-alaninowe tną wiązanie amidowe pomiędzy kwasem N-acetylmuraminowym a pierwszym aa w peptydzie. Są one najczęściej identyfikowaną domeną wśród endolizyn. Endopeptydazy z kolei tną wiązanie peptydowe pomiędzy dwoma aa w peptydzie macierzystym bądź mostku poprzecznym. Pierwszy typ glikozydaz, czyli N-acetylo-β-glukozaminidazy hydrolizują wiązania N-acetyloglukozamylo-β-1,4-N-acetylmuraminowe, w miejscu, gdzie N-acetyloglukozamina znajduje się na redukującym końcu łańcucha peptydoglikanu. Z kolei drugi typ, czyli N-acetylmuramidazy tną wiązania N-acetylmuramylo-β-1,4-N-acetyloglukozaminowe pomiędzy N-acetyloglukozaminą za kwasem N-acetylmuraminowym. Podobnie jak ostatni enzym działa transglikozylaza lityczna z tym, że nie jest to enzym hydrolityczny, a końcowe produkty reakcji różnią się od siebie⁶⁵.

1.4 Autolizyny

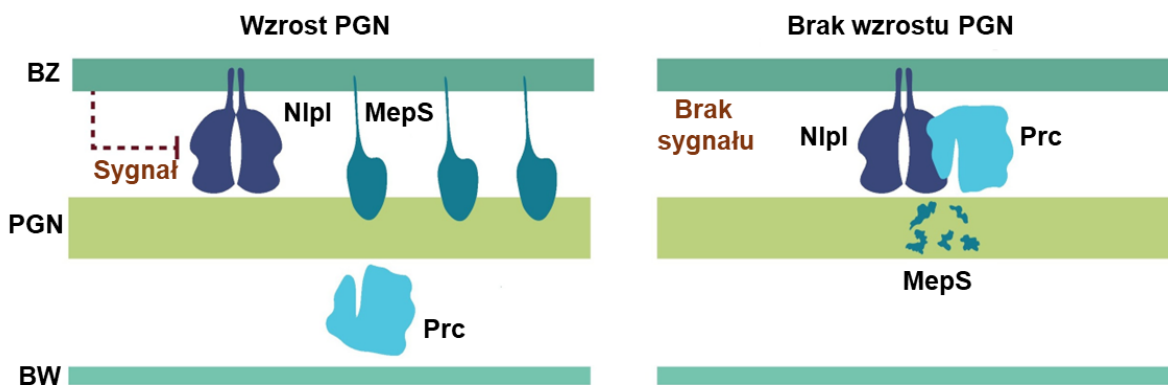
Komórka bakteryjna podlega nieustannemu wzrostowi, morfogenezie i podziałom. Peptydoglikan obecny w komórce jest syntetyzowany jako jedna, duża cząsteczka tworząca rodzaj worka (*ang. sacculus*), który, by umożliwić zajście wymienionych procesów, musi ulegać modyfikacjom. W tym celu bakterie produkują własne autolityczne enzymy zwane autolizynami. Budowa autolizyn jest podobna do endolizyn. Tak jak one mogą mieć budowę globularną lub modułową (Ryc. 3.). Główne klasy enzymów są identyczne jak u endolizyn (Ryc. 4.), ale w przypadku autolizyn można dodać jeszcze karboksypeptydazy,

które przecinają wiązanie peptydowe pomiędzy dwoma końcowymi aa w peptydzie macierzystym⁷².

Autolizyny to endogenne enzymy lityczne, które rozkładają peptydoglikan, dlatego ich aktywność musi być ściśle kontrolowana. Proces ten jest kluczowy dla poprawnego rozwoju i przeżycia bakterii. W przypadku bakterii Gram-dodatnich głównym czynnikiem regulacyjnym są kwasy tejchojowe, które przyłączone do peptydoglikanu kontrolują aktywność autolizyn⁷³. W regulacji aktywności tych enzymów można wyróżnić kilka mechanizmów, m. in.:

- Regulatory białkowe: np. DipM (czynnik stymulujący podział komórki *Caulobacter crescentus*), zdolny jest do regulacji wielu klas autolizyn (amidaz, transglikozylaz i karboksypeptydaz). Dokładny mechanizm aktywacji autolizyn nie jest jeszcze poznany. Przypuszcza się jednak, że w obu klasach, gdy tworzy się kompleks DipM-autolizyna, to dochodzi do interakcji między rowkiem białka DipM a kilkoma regionami autolizyny wywołując zmianę konformacyjną, która zwiększa zdolność wiązania i/lub hydrolizy peptydoglikanu⁷⁴.
- Modyfikacje strukturalne peptydoglikanu: wiązania poprzeczne LD, jakie występują w peptydoglikanie mają działanie inhibitorowe dla transglikozylaz litycznych⁴⁶.
- Systemy dwuskładnikowe, np. LytSR obecny między innymi u *S. aureus*, czy *Staphylococcus lugdunensis*, odpowiadają za adaptację, przetrwanie i zjadliwość bakterii. LytSR reguluje między innymi autolizę u *S. aureus* RN4220^{75,76}.
- Czynniki sigma w reakcji na stres mogą regulować transkrypcję genów kodujących autolizyny⁷⁷.

Jednym z lepiej przebadanych systemów regulujących autolizyny jest NlpI-Prc w *E. coli*. Proteaza Prc odpowiada za degradację endopeptydaz MepS i MepH. Adaptorowa lipoproteina NlpI odbiera sygnał pochodzący z reszt fosfolipidowych obecnych w błonie zewnętrznej oznaczający zapotrzebowanie na ekspansję peptydoglikanu. To prowadzi do przejściowej stabilizacji autolizyny MepS. Gdy takiego sygnału brak, to białko NlpI po utworzeniu homodimeru tworzy kompleks z dwiema cząsteczkami proteazy Prc nadając jej specyficzność wobec autolizyny MepS. Powstały kompleks degraduje MepS (Ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat regulacji autolizyny MepS przez system NlpI-Prc w *E. coli*. Aktywność endpeptydazy MepS (kolor turkusowy) jest regulowana przez kompleks białka adaptorowego NlpI (kolor ciemno-niebieski) z proteazą Prc (kolor jasno-niebieski). Podczas wzrostu peptydoglikanu (PGN) wysyłany jest sygnał (linia przerywana) pochodzący z błony zewnętrznej (BZ), który reguluje aktywność proteolityczną NlpI-Prc, dzięki czemu autolizyna MepS hydrolizuje wiązania PGN. W przypadku braku sygnału powstaje kompleks NlpI-Prc, który degradowuje autolizynę MepS i zapobiega hydrolizie wiązań w PGN. BW – błona wewnętrzna [rycina pochodzi z publikacji i została edytowana⁷²].

System reguluje w ten sposób MepS w zależności od fazy wzrostu. W fazie logarytmicznej MepS występuje w wysokim stężeniu, natomiast w fazie stacjonarnej ulega degradacji. Stwierdzono też, że obfitość występowania MepS jest skorelowana z potrzebą wzrostu osłony komórkowej. Sugeruje to, że NlpI-Prc może odbierać sygnały komórkowe i koordynować wzrost peptydoglikanu ze wzrostem komórki⁷². Z powodu tej funkcji regulacyjnej i zdolności do lizy autolizyn czynniki regulatorowe mogą być potencjalnie brane pod uwagę jako leki antybakteryjne.

Autolizyny pełnią także istotną funkcję w patogenezie jako czynniki wirulencji. Takim znanym czynnikiem u *S. aureus* jest autolizyna Atl, która odpowiada za:

- prezentację powierzchniowych białek wirulencji,
- kontrolę sekrecji toksyn,
- adhezję do komórek gospodarza.

Autolizyny są rozważane jako potencjalne czynniki antybakteryjne, jednak ze względu na swoją wysoką specyficzność prawdopodobnie nie będą one brane pod uwagę w swojej naturalnej formie. Natomiast można wykorzystać pojedyncze domeny i łączyć je z innymi białkami, bądź peptydami antybakteryjnymi. Taką próbę podjęto z pięcioma różnymi autolizynami *S. aureus*, gdzie połączono ich domeny katalityczne (CHAP) z domeną wiążącą ścianę komórkową lizostafiny (bakteriocyny produkowanej przez *Staphylococcus simulans*). W przypadku jednego z wariantów białek fuzyjnych, domeny CHAP autolizyny SsaALP

połączonej z domeną wiążącą lizostafiny, udało się zaobserwować 140-krotny wzrost aktywności litycznej przeciw *S. aureus* w porównaniu do działania pojedynczej domeny katalitycznej autolizyny SsaALP⁷⁸.

1.5 Przykłady badań klinicznych

Endolizyny wykazują niski poziom cytotoksyczności, dlatego upatruje się w nich realną szansę na zastosowanie w medycynie. Jak dotąd badania kliniczne prowadzone są z wykorzystaniem *S. aureus*. Najbardziej obiecującym przykładem była rekombinowana endolizyna CF-301. Pochodzi ona z profaga *Streptococcus suis*, a zbudowana jest z domeny katalitycznej CHAP i domeny wiążącej SH3b⁵⁷. W badaniach klinicznych sprawdzano efektywność działania CF-301 w połączeniu ze standardową terapią antybakteryjną w zakażeniach krwi, w tym w zapaleniu wsierdza. Badania przeszły do trzeciej fazy badań klinicznych (nr badań NCT04160468), jednak musiały zostać przerwane z powodu braku poprawy odpowiedzi klinicznej w ciągu 14 dni. Wynik był nieoczekiwany, ponieważ w drugiej fazie po 14 dniach osiągnięto założony efekt. Sugeruje się, że heterogeniczność grupy oraz jej mała liczebność może tłumaczyć wystąpienie nierównowagi w wielu składowych badaniach zarówno w II jak i w III fazie badań klinicznych⁷⁹.

Innym przykładem jest SAL-200 (N-Rephasin® SAL200), rekombinowana endolizyna SAL-1, która pochodzi z bakteriofaga gronkowcowego SAP-1. Cała formuła leku składa się z: SAL-1, 10 mM Ca²⁺, 0,1 (w/v) poloksameru 188, 0,01 M L-histydyny o pH 6,0 i 5% (w/v) sorbitolu. Jest to kolejny preparat do zwalczania *S. aureus*. Badania przeszły w drugą fazę testów klinicznych, która niestety została przerwana przez sponsora z powodów strategicznych (nr badań: NCT03089697). W drugiej fazie grupa badanych pacjentów liczyła 12 osób, a u dwóch z nich wystąpiły poważne działania niepożądane objawiające się zapaleniem płuc lub niewydolnością oddechową. Należy jednak zaznaczyć, że w grupie kontrolnej u dwóch z trzynastu osób także wystąpiły silne działania niepożądane, czyli zaburzenia pracy serca spowodowane wystąpieniem zakażenia oraz niewydolność oddechowa typu drugiego⁵⁷.

W 2024 r. rozpoczęła się I faza badań klinicznych nad chimeryczną endolizyną bakteriofagową o nazwie HY-133 (nr badań NCT06290557). Ma to być produkt stosowany jako sprej do nosa przeciw *S. aureus*. W lipcu 2026 r. ma zakończyć się pierwsza część badań.

Wciąż istnieje potrzeba poszukiwania leków antybakteryjnych. *S. aureus* to patogen, który wymaga dużej uwagi i stanowi przyczynę niepokojącego odsetka chorób bakteryjnych. Wciąż jednak brakuje badań klinicznych endolizyn skierowanych przeciw wielu innym patogenom.

WHO wskazuje, że w przypadku badań nad lekami antybakteryjnymi sytuacja epidemiologiczna bakterii Gram-ujemnych w porównaniu do Gram-dodatnich jest gorsza. W pierwszej fazie klinicznej obserwuje się coraz więcej badań przeciw bakteriom Gram-ujemnym, jednak są to główne modyfikacje istniejących klas antybiotyków, aktywnych tylko przeciw ograniczonej grupie opornych bakterii⁸⁰.

1.6 Istotne cechy leków przeciwbakteryjnych

Lek, aby spełnił swoją funkcję musi być przede wszystkim skuteczny. Oznacza to, że oczekiwany efekt terapeutyczny powinien być osiągnięty przy jak najniższej dawce. Powinien również cechować się niskim ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych i nie wchodzić w interakcję z innymi substancjami, np. z przyjmowanymi lekami. Forma leku też powinna być łatwa w aplikacji i dobrze tolerowana przez pacjenta oraz łatwo wchłanialna⁸¹⁻⁸³. Według zaleceń WHO produkt leczniczy powinien być przyjmowany między 1-4 razy dziennie, a najlepiej 1-2 razy. Powinien wykazywać niskie ryzyko wykształcenia oporności przez bakterie, a także nie powodować wystąpienia oporności krzyżowej. W przypadku dzieci podaje się jeszcze potrzebę określenia dawki względem masy ciała, najlepiej dostosowaną do wieku⁸⁴.

Koszty produkcji leku, czy dostawy do systemu opieki zdrowotnej powinny być przystępne dla każdego i akceptowalne dla krajów o niskim i średnim dochodzie⁸⁴.

Poza tym lek powinien być stabilny chemicznie, czy fizycznie przy przechowywaniu. Mówi się o stabilności cieplnej, 3-letnim okresie przechowywania na półce w warunkach tropikalnych (30°C) i wilgotnych (około 65% wilgotności)⁸⁴. Te cechy są często charakterystyczne dla białek, które pochodzą z organizmów ekstremofilnych, takich jak halofile lub termofile. Dlatego to właśnie wśród organizmów ekstremofilnych można poszukiwać enzymów, które mogą później spełnić swoje terapeutyczne funkcje.

1.7 Znaczenie stabilności termicznej

Stabilność termiczna białek wydaje się atrakcyjna ze względu na to, że takie białka są często bardziej odporne na proteolizę, czy denaturację chemiczną od mezofilnych i psychrofilnych enzymów⁸⁵. Istnieje kilka powodów, dla których stabilność białek w wysokich temperaturach jest istotnym czynnikiem.

Po pierwsze można je zastosować w biotechnologii. Warto zaznaczyć, że białka takie jak polimerazy DNA często cechują się wysoką stabilnością termiczną, co przydatne jest choćby w łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang. Polymerase Chain Reaction - PCR*). Przykładem jest

termostabilna polimeraza Taq z *Thermus aquaticus*, której użycie zrewolucjonizowało metodę PCR⁸⁶.

Wysoka czystość preparatu białkowego jest jedną z bardziej pożądanых cech niezbędnych do przeprowadzenia kolejnych analiz białka. Przykładowo, do krystalografii rentgenowskiej potrzebna jest czystość rzędu 90-95%. By efektywniej oczyścić termostabilne białko, podczas oczyszczania, po lizie bakterii, można dodać etap polegający na podgrzaniu mieszaniny białek w temperaturze około 70°C przez 20 minut w celu pozbycia się termolabilnych białek gospodarza. Usprawnia to oczyszczanie białek poprzez otrzymanie ostatecznie czystszeo preparatu niż w przypadku pominięcia tego kroku⁸⁷.

Można je zastosować także w przemyśle spożywczym, nie tylko do ochrony żywności, ale także przy jej przetwarzaniu. Za przykład mogą posłużyć glukoamylazy do rozkładania dekstryny na cukry podstawowe, czy produkcji sake, albo nawet przy wypieku chleba, by poprawić kolor skórki i jakość wypieków o wysokiej zawartości błonnika. Enzymy te izoluje się z organizmów termofilnych. Na przykład *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* i *Picrophilus oshimae* produkują glukoamylazy, które są stabilne w ekstremalnie wysokiej temperaturze i kwaśnym pH. Maksymalna aktywność tych enzymów jest osiągniata w 90°C i pH 2,0.⁸⁸

Czas półtrwania białek we krwi powinien być na tyle długi, by efektywnie zadziałały, co często bywa problemem. Jednak są przesłanki, które mówią o tym, że bardziej stabilne termicznie białka wykazują dłuższy czas półtrwania we krwi ludzkiej. Na przykład białko Cas9 ze *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9), aktywne w temperaturze do 45°C, było białkiem o szerokim zastosowaniu. W systemie CRISPR-Cas9, jako potencjalnej metody leczenia chorób genetycznych jednym z wyzwań jest to, że białko Cas9 musi być na tyle stabilne, by przetrwać warunki występujące we krwi lub określonej tkance. Krótki okres półtrwania białka skutkuje słabszą skutecznością edycji, a bardziej stabilny konstrukt mógłby temu zaradzić. Znalaziono białko Cas9 z bakterii termofilnej *Geobacillus stearothermophilus* (GeoCas9), które jest aktywne nawet w 70°C. Białko to okazało się skuteczne w przypadku edycji genomów ssaków i ma dłuższy czas półtrwania w osoczu niż jego mezofilny odpowiednik. W badaniu porównano działanie obu białek w różnych stężeniach ludzkiego osocza w 37°C przez 8 godzin. Aktywność białka SpyCas9 została całkowicie zniesiona niezależnie od stężenia osocza w przeciwieństwie do GeoCas9, które zachowało znaczną część swojej aktywności⁸⁹.

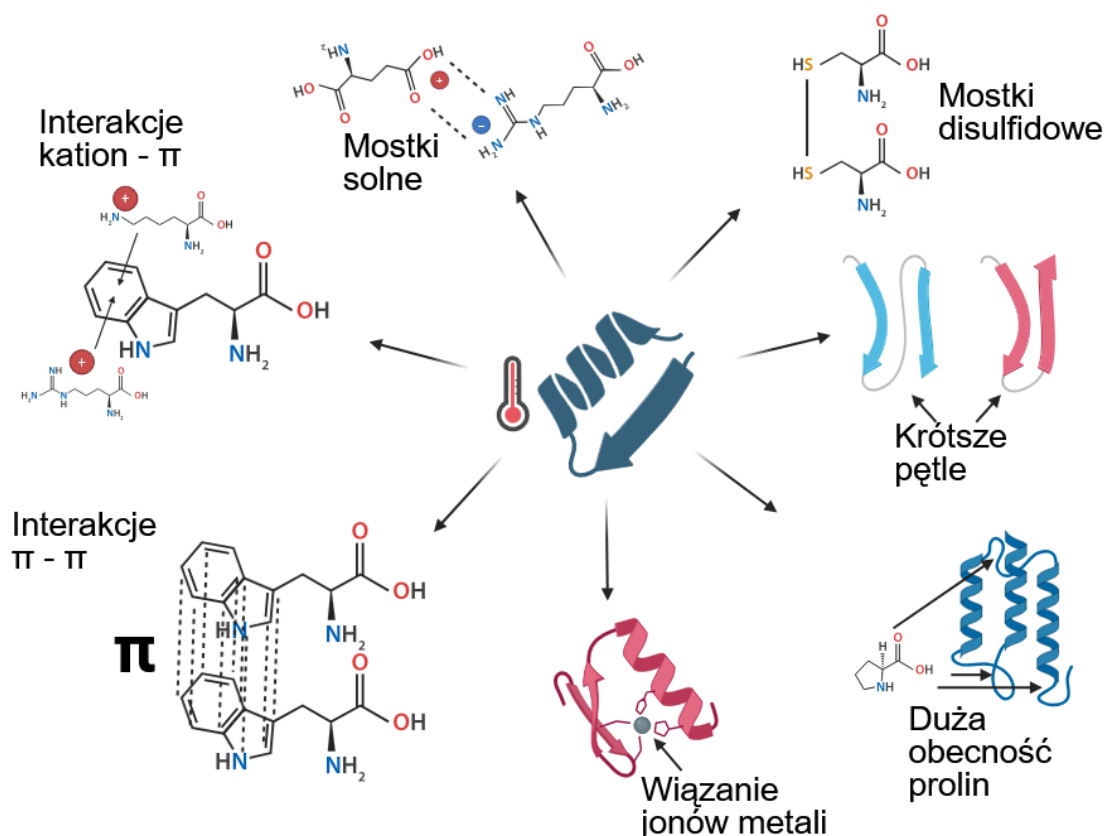
Istnieją też badania, które zaprzeczają jakoby stabilność termiczna miała mieć związek ze zwiększonym czasem półtrwania białka w komórkach. Sprawdzono to w przypadku białek lizosomalnych. W badaniu stworzono wariant, który wykazywał wyższą temperaturę topnienia o 8,8°C, jednak po sprawdzeniu, czasu półtrwania wariantu i białka dzikiego nie różniły się od siebie. Badania te były poparte szerokimi badaniami proteomicznymi. Wykazano jednak zależność, że białka lizosomalne mające wyższą temperaturę topnienia mają też krótszy okres półtrwania w porównaniu z białkami innych organelli⁹⁰.

W przypadku endolizyn jednym z głównych ograniczeń zastosowania terapeutycznego jest ich krótki okres półtrwania w surowicy. Głównym powodem jest wydalanie przez nerki, czy degradacja lizosomalna. Ostatnie doniesienia odnośnie SAL200 mówią o tym, że okres półtrwania w ludzkiej krwi wynosi od 0,04 do 0,38 godziny^{91,92}, w przeciwieństwie do małp gdzie czas ten wynosi od 0,3 do 9,7 godzin⁹³. Jak dotąd próbowano na przykład łączyć endolizynę z domeną wiążącą albuminę, by zwiększyć jej okres półtrwania w surowicy⁹¹. Nie odnotowano jednak dotąd badań, które pokazywałyby, czy termicznie stabilne endolizyny cechują się dłuższym czasem półtrwania we krwi.

Badania nad stabilnością termiczną mogą przynieść wiele pozytywnych konsekwencji. Począwszy od zastosowania ich jako enzymy stosowane w przemyśle spożywczym w procesach wymagających wysokiej temperatury, jak pieczenie, przechodząc do efektywnego oczyszczania preparatów, wykorzystania ich w metodach biologii molekularnej, po stabilność ogółem i oporności na proteolizę.

1.8 Elementy istotne w stabilności termicznej białek

Mówiąc o stabilnych termicznie białkach należy wspomnieć o ich cechach, które na tę stabilność wpływają. Na Ryc. 6 schematycznie przedstawione są elementy, które uważa się za istotne w kontekście stabilności termicznej białek.



Ryc. 6. Schemat przedstawiający czynniki wpływające na stabilność termiczną białek.

Rozpatrując struktury przestrzenne białek termofilnych, można zauważyć, że są one bardziej zwarte, krótsze i z ograniczoną dynamiką konformacyjną niż białka mezofilne⁸⁵. Białka termofilne na rzecz aktywności nadal muszą zachować pewną dynamikę strukturalną. W badaniu, gdzie porównywano ze sobą dwa ortologi RNazy H, pochodzenia termofilnego (z *Thermus thermophilus* i mezofilnego z *Escherichia coli*), zidentyfikowano pięć konserwowanych regionów o podwyższonej lokalnej dynamice konformacyjnej, co wyraźnie wskazuje na ich znaczenie katalityczne. Jednak porównując dynamikę konformacyjną szkieletów obu białek w tej samej temperaturze, to białko stabilne termicznie przejawiało mniejszą ruchliwość konformacyjną⁹⁴.

Obecność wiązań disulfidowych tworzonych przez pary cystein, także może wpływać korzystnie na stabilność termiczną poprzez zmniejszenie entropii. Usunięcie wiązania disulfidowego w białku PaCS tworzonego przez reszty Cys19 – Cys394 wywołało obniżenie T_m z 84°C do 73,5°C⁹⁵.

Hydrofobowy rdzeń termofilnych białek zapewnia ich lepsze upakowanie. W hydrofobowych regionach białek szczególnie zwraca się uwagę na obecność izoleucyny (Ile, I) i waliny (Val, V), których jest więcej u białek termofilnych, natomiast leucyna (Leu, L) nie

jest już tak preferowana i występuje w mniejszej ilości. Jest tak prawdopodobnie przez fakt, że atomy węgla w łańcuchu bocznym Ile mogą występować we wszystkich trzech stanach rotametrycznych χ w przeciwieństwie do Leu, gdzie mogą występować tylko dwa⁹⁶. Daje to możliwość ciaśniejszego upakowania łańcuchów bocznych, które są w tych aa rozgałęzione. Walina z kolei jest mniejsza i jej ograniczona ruchliwość poprawia pakowanie rdzenia.

Prolina, która także jest aminokwasem niepolarnym występuje częściej w białkach termofilnych niż mezofilnych. Ma ona strukturę o bardzo ograniczonej ruchliwości konformacyjnej i często występuje na pętlach, stabilizując je. Może ona oddziaływać z resztami hydrofobowymi znajdującymi się na powierzchni białka, co pomaga zapobiegać rozfałdowaniu w wyższej temperaturze⁹⁷.

W przypadku pozostałych niepolarnych aminokwasów zwykle wskazuje się, że metioniny (Met, M) jest mniej prawdopodobnie przez wrażliwość tej reszty na oksydację, a glicyny (Gly, G) i alaniny (Ala, A) ze względu na oddziaływania o krótkim zasięgu^{96,97}.

Interakcje aromatyczne zachodzące pomiędzy aa aromatycznymi ($\pi - \pi$), jak tryptofan (Trp), tyrozyna (Tyr), fenyloalanina (Phe), czy histydyna (His) a także kation - π , które zachodzą pomiędzy pierścieniem aromatycznym aa, a łańcuchem bocznym dodatnio naładowanych reszt, to bardzo silne oddziaływania, których w termofilnych białkach jest zdecydowanie więcej niż w mezofilnych. Na przykład alfa-amylaza *Pyrococcus furiosus* zawiera 5% więcej reszt aromatycznych, niż jej homolog z *Bacillus licheniformis*⁸⁵.

Obecność jonów metali także znacząco wpływa na stabilność termiczną białek. Podczas badań nad dwunuklearnym centrum miedziowym podjednostki II oksydazy cytochromu C z *Thermus thermophilus* (TtCu_A) zbadano, że holoenzym był bardziej stabilny od apoenzymu (brak wiązania jonu)⁹⁸. Wiele innych badań także wskazuje na korelację między wiązaniem jonów metali a stabilnością termiczną^{99,100}.

Mostki solne także wykazują rolę stabilizującą w białkach. Są to elektrostatyczne interakcje pomiędzy aminokwasami dodatnio naładowanymi (arginina (Arg), lizyna (Liz), histydyna (His, w pH \leq 6)) i naładowanymi ujemnie (kwas asparaginowy (Asp), kwas glutaminowy (Glu)). Mostki solne, które schowane są w wewnętrznej części białka mogą odgrywać funkcjonalną, albo strukturalną rolę. W przypadku białek termofilnych obserwuje się więcej mostków solnych na ich powierzchni niż ma to miejsce w przypadku mezofilnych, czy psychofilnych białek. Co więcej nie sama ilość ma znaczenie, a sieć, w jaką mostki są zorganizowane^{101,102}. Przykładem może być aqualizyna 1 (AQUI), która jest proteazą serynową typu subtilizynowego (podobna

do subtilaz, które na podstawie homologii sekwencji klasyfikuje się do grupy proteaz typu proteinazy K) z *Thermus aquaticus*. Mutacja R43 i D21 wpłynęła na stabilność termiczną białka zaburzając sieć mostków solnych tworzonych przez R43 – D212 – R47 – E48 powodując obniżenie T_m o około 2-3°C. Z kolei w wariacie D17N, który naruszył węzeł sieci mostków solnych łączący N-końcowe i C-końcowe regiony białka, temperatura T_m spadła o ~9°C. Natomiast wprowadzane zmiany w innych, pojedynczych parach mostków solnych nie miały wpływu na stabilność termiczną białka¹⁰¹.

Pomiędzy białkami mezofilnymi i termofilnymi występują różnice w częstotliwości występowania niektórych aminokwasów. Wskazuje się, że szczególnie aa aromatyczne i hydrofobowe występują częściej u białek termofilnych. Są to lizyna, arginina, tyrozyna, czy tryptofan, ale także prolina, czy izoleucyna. Aa, których zwykle jest mniej w białkach termofilnych, to leucyna, treonina, glutamina, asparagina, seryna, cysteina i metionina^{96,97}.

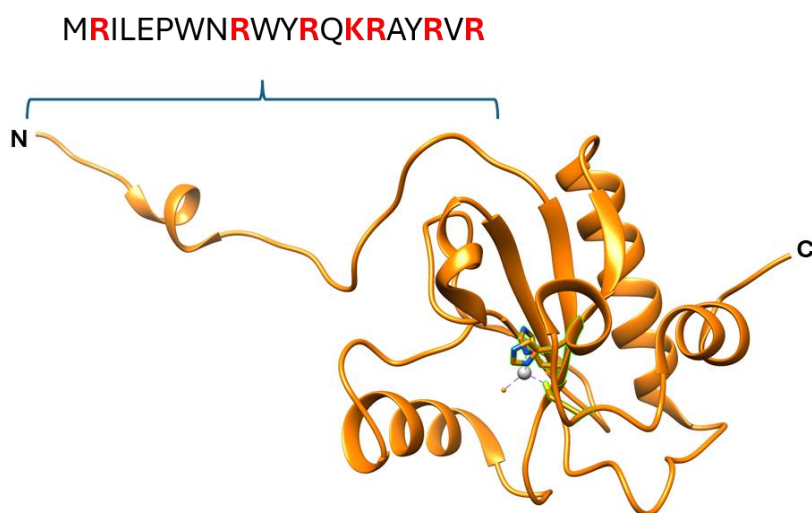
1.9 Organizmy termofilne źródłem enzymów

Termofile należą do ekstremofilnych organizmów, które muszą przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiskowych, takich jak wysoka temperatura, wysokie ciśnienie, różne wartości pH i zasolenie. Enzymy w takim organizmie również muszą sprostać niesprzyjającym warunkom, co objawia się opornością na denaturację, czy proteolizę. Te właściwości czynią je bardzo użytecznymi nie tylko w procesach, które wymagają wysokiej temperatury, jak PCR, ale także w przypadku zjawiska stabilności leków. Przykładem mogą być szczepionki, które trzeba przechowywać w lodówce, a czasem w zamrażarce (-20°C lub -80°C). Istnieje globalna potrzeba, by były one stabilne w temperaturach 16-45°C¹⁰³. Dotyczy to także leków przeciwbakteryjnych, leków stosowanych na rany, czy dla wygody użytkowania, np. w przypadku insuliny dla cukrzyków. Poza lekami, w rolnictwie, przemyśle spożywczym, czy włókienniczym to termostabilne enzymy mogą być potencjalnymi, stabilnymi w wyższych temperaturach, środkami biodegradującymi⁸⁸.

Takich organizmów można szukać w kominach hydrotermalnych, gorących źródłach, kwaśnych źródłach geotermalnych, czy na polach solfatarycznych¹⁰⁴. Do odkrycia enzymów termofilnych kodowanych w genomach ekstremofili w dużym stopniu przyczyniają się również badania metagenomowe⁸⁸.

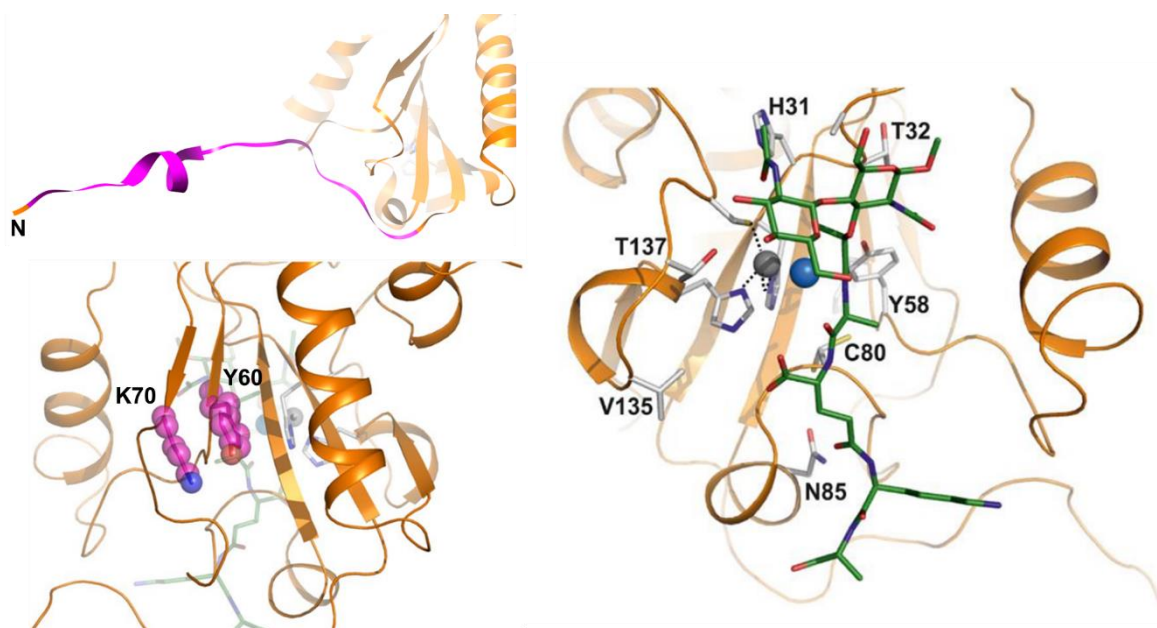
1.10 Endolizyna Ts2631

Obiektem podjętych badań jest endolizyna Ts2631 (Ryc. 6). Białko to cechuje temperatura topnienia wynosząca 99,82°C. Pochodzi z bakteriofaga vB_Tsc2631 wyizolowanego z gorących źródeł usytuowanych w rejonie Hveragerdi południowej części Islandii. Bakteriofag ten infekuje Gram-ujemne bakterie *Thermus scotoductus*. Endolizyna Ts2631 to małe globularne białko o długości 156 aa i masie molekularnej 18,07 kDa. Należy do rodziny amidaz N-acetylomuramyl-L-alaninowych (EC 3.5.1.28) i jest to amidaza typu 2 (PFAM: PF01510). Endolizyna Ts2631 zawiera domenę charakterystyczną dla białek eukariotycznych rozpoznających peptydoglikan (ang. *Peptidoglycan Recognition Protein*, PGRP)¹⁰⁵. Endolizyna Ts2631 jest podobna m. in. do ludzkiego PGRP-I β (PDB: 2EAX¹⁰⁶). Domena PGRP w białku Ts2631 znajduje się pomiędzy 23 a 143 aa. W miejscu aktywnym znajduje się jon Zn^{2+} koordynowany bezpośrednio przez trzy reszty aa H30, H131 i C139, oraz czwartą Y58, pośrednio poprzez cząsteczkę wody. Taki motyw wiązania jonów Zn^{2+} jest charakterystyczny również dla PGRP, czy lizozymu T7. W badaniach nad endolizyną Ts2631 zaobserwowano, że reszty koordynujące ten jon muszą mieć znaczenie w stabilności termicznej, ponieważ ich warianty substytucyjne (H30N, H131N i C139S) tworzyły agregaty już w temperaturze $\geq 75^\circ C$, podczas gdy białko typu dzikiego było w formie rozpuszczalnej nawet w temperaturze $100^\circ C$ ¹⁰⁵.



Ryc. 7. Struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG). Klamrą zaznaczono dodatnio naładowany fragment białka, który między innymi bierze udział w wiązaniu peptydoglikanu. N – N-koniec białka, C – C-koniec białka. Na szaro zaznaczony jest jon Zn^{2+} . Kolorem czerwonym zaznaczono dodatnio naładowane reszty aminokwasowe: argininę (R) i lizynę (K).

W swojej budowie endolizyna Ts2631 odznacza się N-kończowym dodatnio naładowanym wydłużeniem, dzięki któremu może przedostać się przez błonę zewnętrzną Gram-ujemnej komórki do warstwy PGN. Wiadomo, że N-końcowy region endolizyny Ts2631 bierze udział w wiązaniu PGN. W wiązanie to zaangażowane są także 2 aa: Y60 i K70 oraz reszty położone w tzw. rowku wiążącym substrat (PGN), jednak cały mechanizm wiązania nie jest dokładnie zbadany.



Ryc. 8. Regiony endolizyny Ts2631 odpowiadające za wiązanie z peptydoglikanem (PGN). Na różowo zaznaczone są N-końcowe wydłużenie, reszty Y60 i K70. Po prawej stronie widać przednią część rowka wiążącego PGN z zaznaczonymi resztami, które wiążą fragment PGN oznaczony kolorem zielonym [rycina wzorowana na publikacji została zmodyfikowana¹⁰⁷].

Endolizyna Ts2631 jest aktywna nie tylko wobec bakterii z rodzaju *Thermus*, ale także lizuje mezofilne bakterie Gram-ujemne, w tym *Acinetobacter baumannii* odporny na karbapenemy, patogen z grupy ESKAPE. Mechanizm termostabilności endolizyny Ts2631 jest słabo poznany, dlatego w niniejszej pracy skupiono się na rozwinięciu tej wiedzy.

2. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była analiza mechanizmu stabilności termicznej endolizyny Ts2631 bakteriofaga vB_Tsc2631 infekującego komórki *Thermus scotoeductus*.

Cele szczegółowe, jakie wyznaczono to:

1. Analiza sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 pod kątem identyfikacji determinant termostabilności.
2. Analiza wariantów substytucyjnych endolizyny Ts2631, w tym badanie ich funkcjonalności oraz temperatury topnienia.
3. Poszukiwania strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 o pochodzeniu mezofilnym.
4. Oczyszczanie i charakterystyka funkcjonalna strukturalnych homologów endolizyny Ts2631.
5. Uzyskanie i analiza wariantów substytucyjnych białek mezofilnych będących homologami endolizyny Ts2631 pod kątem ich stabilności termicznej w celu uzyskania bardziej stabilnego termicznie białka mezofilnego z zachowaniem jego niezmięnionej funkcji litycznej.

3. Materiały

3.1 Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne wykorzystane w tej pracy znajdują się w Tab. 1.

Tab. 1. Lista szczepów bakterii wykorzystanych w pracy.

Lp.	Nazwa szczepu	Źródło
1.	<i>Acinetobacter baumannii</i> KPD 735	Kolekcja Plazmidów i Drobnoustrojów KPD, Katedra Mikrobiologii (KM), Polska
2.	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	American Type Culture Collection (ATCC), USA
3.	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 23778	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy
4.	<i>Citrobacter braakii</i> KPD 218	KPD, KM, Polska
5.	<i>Clostridium felsineum</i> DSM 794	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy
6.	<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 791	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy
7.	<i>Clostridium sporogenes</i> DSM 767	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy
8.	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	KM, UG, Polska
9.	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3[pRARE])	KM, UG, Polska
10.	<i>Escherichia coli</i> C41(DE3)	KM, UG, Polska
11.	<i>Escherichia coli</i> C43(DE3)	KM, UG, Polska
12.	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	KM, UG, Polska
13.	<i>Escherichia coli</i> MG1655	KM, UG, Polska
14.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPD 298	KPD, KM, Polska
15.	<i>Listeria monocytogenes</i> KPD 1328	KPD, KM, Polska
16.	<i>Nocardia brasiliensis</i> DSM 43758	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy
17.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 430	KPD, KM, Polska
18.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	KM, UG, Polska
19.	<i>Salmonella enterica</i> serowar Panama	KM, UG, Polska
20.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC, USA
21.	<i>Staphylococcus aureus</i> KPD 425 (MRSA)	KPD, KM, Polska
22.	<i>Thermus thermophilus</i> HB8 DSM 579	Leibniz Institute DSMZ, Niemcy

3.2 Plazmidy

pET-15b, pRARE

3.3 Sekwencje nukleotydowe białek, których synteza została zamówiona w firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Germany).

Tab. 2. Sekwencje nukleotydowe białek analizowanych w niniejszej pracy. Na zielono zaznaczono sekwencję nukleotydową znacznika histydynowego oraz sekwencję pochodzącą z wektora.

L. p.	Nazwa białka	Sekwencja nukleotydowa genu białka
1.	K11gp3.5_WT	<p>CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG CCATATGGCCAAAGTGCAGTTTACCAAACGTCAAGAAACCAGCC AGATTTTTGTTTCATTGTAGCGCAACCAAAGCCAATATGGATGTTG GTGTTTCGTGAAATTCGTCAGTGGCATAAAGAACAAGGTTGGCTG GATGTGGGTTATCATTTTATCATTTCGTCGTGATGGCACCGTTGAA GCAGGTCGTGATCAGGATGCAGTTGGTAGCCATGTTAAAGGTTAT AATAGCACCAGCGTTGGTGTGTTGTCTGGTGGTGGTATTGATGCA AAAGGTAATCCGGAAGCAAATTTTACACCGCAGCAGATGAGCGC ACTGAATGGTCTGCTGCATGAACTGCGTGGCACCTATCCGAAAG CAGTTATTATGGCACATCACGATGTTGCACCGAAAGCATGTCCGT CATTGATCTGCAGCGTTGGGTTAAAACCGGTGAACTGGTTACC AGCGATCGTGGT</p>
2.	K11gp3.5_N91W_M10 1W_Q137W	<p>CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG CCATATGGCCAAAGTGCAGTTTACCAAACGTCAAGAAACCAGCC AGATTTTTGTTTCATTGTAGCGCAACCAAAGCCAATATGGATGTTG GTGTTTCGTGAAATTCGTCAGTGGCATAAAGAACAAGGTTGGCTG GATGTGGGTTATCATTTTATCATTTCGTCGTGATGGCACCGTTGAA GCAGGTCGTGATCAGGATGCAGTTGGTAGCCATGTTAAAGGTTAT AATAGCACCAGCGTTGGTGTGTTGTCTGGTGGTGGTATTGATGCA AAAGGTTGGCCGGAAGCAAATTTTACACCGCAGCAGTGGAGCG CACTGAATGGTCTGCTGCATGAACTGCGTGGCACCTATCCGAAA GCAGTTATTATGGCACATCACGATGTTGCACCGAAAGCATGTCCG TCATTTGATCTGTGGCGTTGGGTTAAAACCGGTGAACTGGTTACC AGCGATCGTGGT</p>
3.	K11gp3.5_F96W_L136 W	<p>CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG CCATATGGCCAAAGTGCAGTTTACCAAACGTCAAGAAACCAGCC AGATTTTTGTTTCATTGTAGCGCAACCAAAGCCAATATGGATGTTG GTGTTTCGTGAAATTCGTCAGTGGCATAAAGAACAAGGTTGGCTG GATGTGGGTTATCATTTTATCATTTCGTCGTGATGGCACCGTTGAA GCAGGTCGTGATCAGGATGCAGTTGGTAGCCATGTTAAAGGTTAT AATAGCACCAGCGTTGGTGTGTTGTCTGGTGGTGGTATTGATGCA AAAGGTAATCCGGAAGCAAATTGGACACCGCAGCAGATGAGCG CACTGAATGGTCTGCTGCATGAACTGCGTGGCACCTATCCGAAA GCAGTTATTATGGCACATCACGATGTTGCACCGAAAGCATGTCCG</p>

		TCATTTGATTGGCAGCGTTGGGTTAAAACCGGTGAACTGGTTAC CAGCGATCGTGGT
4.	LytO	CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG CCATATGCAGGCAAAACTGACCAAAAACGAATTTATCGAATGGC TGAAAACCAGCGAAGGCAAACAGTTTAATGTTGATCTGTGGTAT GGCTTCCAGTGCTTTGATTATGCAAATGCAGGTTGGAAAGTTCTG TTTGGTCTGCTGCTGAAAGGTCTGGGTGCAAAGATATCCGTTT GCCAATAACTTTGATGGTCTGGCAACCGTGTATCAGAATACACCG GATTTTCTGGCACAGCCTGGTGATATGGTTGTTTTTGGTAGCAAT TATGGTGCCGTTATGGTCATGTTGCATGGGTTATTGAAGCAACC CTGGATTATATCATCGTGTATGAACAGAATTGGTTAGGTGGTGGT TGGACCGATGGTATTGAACAGCCAGGTTGGGGTTGGGAAAAAGT TACCCGTCGTCAGCATGCATATGACTTTCCGATGTGGTTTATTCGT CCGAACTTTAAAAGCGAAACCGCACCGCGTAGCGTTCAGAGCC CGACACAGGCACCGAAGAAAGAAACCGCAAACCGCAGCCGA AAGCAGTTGAACTGAAAATCATTAAAGATGTGGTGAAAGGCTAT GATCTGCCGAAACGTGGTAGTAATCCGAAAGGTATTGTGATTCAT AATGACGCAGGTAGCAAAGGTGCAACAGCCGAAGCATATCGTAA TGGTCTGGTTAATGCACCGCTGAGCCGTCTGGAAGCAGGTATTG CACATAGTTATGTTAGCGGTAATACCGTTTGGCAGGCACTGGATG AAAGTCAGGTTGGTTGGCATAACCGCAAATCAGATTGGCAACAAA TACTATTATGGCATCGAAGTTTGTGAGAGCATGGGTGCAGATAAT GCAACCTTTCTGAAAAATGAACAGGCCACCTTTCAAGAATGTGC ACGTCTGCTGAAAAAGTGGGGTCTGCCTGCAAATCGTAATACCA TTCGTCTGCATAATGAATTTACCAGCACCGCTGTCCGCATCGTA GCAGCGTTCTGCATACCGGTTTTGATCCGGTTACACGTGGCCTGC TGCCGGAAGATAAACGCCTGCAGCTGAAAGATTATTCATTAAGC AGATCCGTGCCTACATGGATGGTAAAATTCCGGTTGCCACCGTTA GCAATGAAAGCAGCGCAAGCAGCAATACCGTTAAACCGGTTGC AAGCGCATGGAAACGTAACAAATATGGCACCTATTATATGGAAGA AAGCGCACGTTTTACCAATGGTAATCAGCCGATTACAGTTCGTAA AGTTGGTCCGTTTCTGAGCTGTCCGGTTGGTTATCAGTTTCAGCC AGGTGGTTATTGCGATTATACCGAAGTTATGCTGCAGGATGGCCA TGTTTGGGTGGGTTATACCTGGGAAGGTCAGCGTTATTATCTGCC GATTCGTACCTGGAATGGTAGCGCACCGCTAATCAGATTCTGGG CGATCTGTGGGGTGAAATTAGC
5.	LytO domena amidazy	CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG CCATATGCAGCCTAAAGCCGTTGAACTGAAAATTATTAAGACGT TGTGAAGGGTTACGATCTGCCGAAACGCGGTAGCAATCCGAAAG GTATTGTGATTCATAATGATGCCGGTAGCAAAGGTGCAACCGCAG

AAGCCTATCGCAATGGTCTGGTTAATGCCCCGCTGAGTCGTCTGG
AAGCCGGCATTGCCCATAGTTATGTGAGCGGCAATACCGTTTGGC
AGGCCCTGGATGAAAGTCAGGTTGGTTGGCATAACGCAAATCAG
ATTGGTAATAAATATTACTACGGCATTGAGGTTTGCCAGAGCATG
GGTGCAGATAATGCCACCTTTCTGAAAAATGAACAGGCCACCTT
TCAGGAATGTGCCGTCTGCTGAAAAATGGGGTCTGCCGGCCA
ATCGTAATACCATTTCGTCTGCATAATGAATTTACCAGTACCAGCTG
TCCGCATCGTAGTAGTGTCTGCATAACGGCTTTGATCCGGTGAC
CCGCGGTCTGCTGCCGGAAGATAAACGTCTGCAGCTGAAAGATT
ATTTATTAACAGATCCGCGCATATATGGATGGCAAATTCGGT
G

6. LytO domena amidazy
Q115W_F179W

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG
CCATATGCAGCCTAAAGCCGTTGAACTGAAAATTATTAAGACGT
TGTGAAGGGTTACGATCTGCCGAAACGCGGTAGCAATCCGAAAG
GTATTGTGATTCATAATGATGCCGGTAGCAAAGGTGCAACCGCAG
AAGCCTATCGCAATGGTCTGGTTAATGCCCCGCTGAGTCGTCTGG
AAGCCGGCATTGCCCATAGTTATGTGAGCGGCAATACCGTTTGGC
AGGCCCTGGATGAAAGTCAGGTTGGTTGGCATAACGCAAATCAG
ATTGGTAATAAATATTACTACGGCATTGAGGTTTGCCAGAGCATG
GGTGCAGATAATGCCACCTTTCTGAAAAATGAATGGGCCACCTTT
CAGGAATGCGCACGTCTGCTGAAAAATGGGGCCTGCCGGCAA
ATCGCAATACCATTTCGCTGCATAATGAATTTACCAGCACCAGTT
GCCCCATCGTAGCAGCGTTCTGCATAACGGCTTTGATCCGGTTA
CCC GCGCCTGCTGCCGGAAGATAAACGCCTGCAGCTGAAAGAT
TATTGGATTAACAGATTCGTGCCTATATGGATGGCAAATTCGG
GTG

7. LytA_27

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG
CCATATGGACGACAAAACTATATTCTGGGCGTTATTGATAGTCC
GGTTGATCTGCGTGATTATGATTATAGCATGATTAGCAGCAGCAG
CGAGAAAATTGATATCCTGGAAGAATTCATCCTGGATTATGACTA
TCCGATTCTGTGTCAGGGTCAAGTTGGTAGCTGTGTTGCACATGC
ACTGAGCGAAATGAAAAGCTATATTGATGCAGTGAGCAGCAACG
ATATGTATAGCGTTGGTTTTATCTATGCCAACGCCAAGAGAATG
ATTACAAAGGCACCGGTATGGTTACCCGTGAAGCACTGCGTAAT
CTGGTTAAATTTGGTGATTGTAAAAAGACGAGCTTTCCGGTGAAT
GAAGAATATCCGAGCATTGTTACCACGCTGGATAAATACAACAA
GAAAAAGCTGCTGGATGAAGCCGATGATCATAAAAGCCTGGCAT
ATATCTATCTGAGCACC GAAGATATCAAAGAATACCTGGTGAAAT
ACCAGAAACCGATTCTGCTGACCTGTTATGTGTATGATAACTTCT
ATGAAGCCAACACCAACAAAGGCATTATCCGAACATTCCGAAT

GGTAGCAAACAGGGTAGCCATGCAATGCTGTGTATTGGTTATAAA
GAAGGTAGCCTGATTCTGATTAATAGCTGGGGTGATTGGAATGGT
GATAAAGGCAAATATTATCTGGACATCGACAGCAACATCATCAA
GAACTGTGGGTGCTTGAGGACATCAAAAATGTTAAAGTTCCGGA
AGTCGAAATCTACAAAGTTGGCTGGAACAAAAACGATAAAGGTT
GGTGGTATAGCGAAGATGGCAACACCTATTATGAAGAATGTTGG
AAGCAGATCAAAGAAAGCTGGTACTATTTTAAACAACGAGGGCTA
TGCAATTGATGGCGATTGGATTACGTACAAGAACAATGGTATTA
CCTGGAAAGCGAAACCTGTGCAATGGTTGTTGATAAATGGATTT
CGTGGAAAGGTAAATGGTATCGCGTTGGTAATGATGGTATTATGC
TGACCGGTTGGTATCAGGATACCGATACGAATTGGTACTATCTGG
ATATTGACAAAGGCTACTGCTATGTGAATTGCACCATTCTGATTG
ATGGCAAGAACTATAGCTTTGATAGCAATGGTGCCTGGATTA
ACACCACCTTTAACTGTATTGATGTCGGTCTGGATTTTGGCAGCA
TGAATATGACCAATAATCCGTCCATTAGCATCGTGCATCATATTGA
AGCGGAAGGTAGCAATTGGACCGTTGAAATGATTCACAACATGC
ACAAAATGAAAATGGCTGGGCAGGTATTGGCTATCATTATTACA
TTCGTCTGGATGGCAGCGTGTATAAAGGTCGTCCGGATAATGCAA
TTGGTGCACATTGTCAGGGTGCAAATACCAATAGCCTGGGTATTG
CATTTGAAGGCAATTATGATACCCGTACACAGATGCCGGAAGCAC
AGTATAATAGTTGGTGTGAGCTGAAAGCATACTGTGGAACAAAT
ATGGTAATATGCCGTTTATGGTCACCGTGAAAAGGTAGCAGC
GAATGTCCGGGTAAATACTTTCCTCTGGACAAAATCAAAAACGC
C

8. O3I_029140

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAG
CCATATGACCCAGCTGATTGATTTTAGCGCAGCACTGATTGAACC
GGCAGATATTCGTGCAGCAGGTTTTGCCGGTGTGTTGGTTATTT
TAGCGAAAGCCGTCCGGGTACAAATTTTGGTGCCAAACCGCTGC
GTCGTGATTATTGTGATCGTCTGCGTGCAGAAGGTCTGGAAATTG
TTACCAATTATCAGTATGGTAAAGGTCCGACCGCAGATTGGCGTG
GTGGTTATGATGGTGGTGCACGTCATGCAGAAACCGCACTGCGT
TTTCATTTTGAAGCCGGTGGTCCGGGTATCGTCCGCTGTATGCA
CCGGTTGATGATAATCCGACACTGGATGAATGGAATAGCCTGATT
GCACCGTTTCTGCGTGGTTGGCAAGCGTTGTTGGTCCGGAATG
GACCGGTGTTTATTGTAATGCACGTTGATTGATTGGGCCCTAGA
AGATGGTGTGGTGCAGTGGTTTTGGCAGCATAATTGGAGCGGTG
ATCCGAGCATTAAATGAACATCATCCGGCAGCACATATGCATCAGA
TTGAAATTGATCAGCGTGAATCAGCGGTGTTGGTATTGATGTTA
ATGAAGTTCTGCGTCCGGATTATGGCCAGTGGTGCAGCAGCACGT
ACCCCTGGTCCGGTTAGCCCGATTAGCCGTGAAGATGATCAGAC

CGGTATTAGCCCGAATACCAGCAGCCGTGGTGGCGCACCCGGTTC
TGTGGTTTCTGCTGCATACCCAAGAAGGTAACGGCGACGCACAG
AGCCTGGCAAATTATCTGCAGAATCCGAATAGCGGTGTGAGCTAT
CATTATACCGATGATAATACCGGCACCGTTATTGATGTGGTTGATA
CCGATCTGGCAAGCTGGTCAGTTCTGAGCGGTAATAGCCGTAGC
ATTAATCTGTGTTTTGCAGGTAGCCGTGCAGCATGGTCACGTGAT
GAATGGTTTGCCCGTATGCAGCGTGGCATTGATTGTGCAGCCTGG
CTGGCAGTTCAGGATTGTCGTAATATGGTCTGCCGATTCTGTACC
ATTAGTCCGGAAGAAGACTGGGTGCAGATGAACGTGGTGTTCAGA
TCACAATGCATATACCATTGGTAAACGTGATGGCACCCATACCGA
TGTGGGTCCGAATTTCCGTGGGATTATCTGAATGCAAACTGGC
AGAATATGGTGGC

3.4 Startery do mutagenyzy miejscowo-specyficznej

Wszystkie startery wykorzystane w pracy znajdują się w Tab. 3.

Tab. 3. Lista sekwencji oligonukleotydów wykorzystanych do mutagenyzy miejscowo-specyficznej.

Wariant	Nazwa startera	Sekwencja oligonukleotydowa (5' → 3')	Zmiana
Ts2631_R2A	Ts2631_R2A_F	GCGCGGCAGCCATATGGCGATACTAGAACCATGG	AGG → GCG
	Ts2631_R2A_R	CCATGGTTCTAGTATCGCCATATGGCTGCCGCGC	
Ts2631_P6A	Ts2631_P6A_F	CCATATGAGGATACTAGAAGCATGGAATAGGTGG TACAG	CCA → GCA
	Ts2631_P6A_R	CTGTACCACCTATTCCATGCTTCTAGTATCCTCATA TGG	
Ts2631_W7A	Ts2631_W7A_F	CATATGAGGATACTAGAACCAGCGAATAGGTGGT ACAGGCAAAA	TGG → GCG
	Ts2631_W7A_R	TTTTGCCTGTACCACCTATTTCGCTGGTTCTAGTATC CTCATATG	
Ts2631_R9A	Ts2631_R9A_F	ATATGAGGATACTAGAACCATGGAATGCGTGGTA CAGGCAAAAAG	AGG → GCG
	Ts2631_R9A_R	CTTTTGCCTGTACCACGCATTCCATGGTTCTAGTAT CCTCATAT	
Ts2631_W10A	Ts2631_W10A_F	CTAGAACCATGGAATAGGGCGTACAGGCAAAAAGA GGGC	TGG → GCG

	Ts2631_W10A _R	GCCCTCTTTTGCCTGTACGCCCTATTCCATGGTTCT AG	
Ts2631_R12A	Ts2631_R12A_ F	CATGGAATAGGTGGTACGCGCAAAAGAGGGCCTA CC	AGG → GCG
	Ts2631_R12A_ R	GGTAGGCCCTCTTTTGCGCGTACCACCTATTCCAT G	
Ts2631_R15A	Ts2631_R15A_ F	TGGTACAGGCAAAAGGCGGCCTACCGGGTACG F	AGG → GCG
	Ts2631_R15A_ R	CGTACCCGGTAGGCCGCTTTTGCCTGTACCA R	
Ts2631_R18A	Ts2631_R18A_ F	CAAAAGAGGGCCTACGCGGTACGGCTAACGCC F	CGG → GCG
	Ts2631_R18A_ R	GGCGTTAGCCGTACCGCGTAGGCCCTCTTTTG R	
Ts2631_R20A	Ts2631_R20A_ F	GAGGGCCTACCGGGTAGCGCTAACGCCTAT F	CGG → GCG
	Ts2631_R20A_ R	ATAGGCGTTAGCGCTACCCGGTAGGCCCTC R	
Ts2631_P23A	Ts2631_P23A_ F	CGGGTACGGCTAACGGCTATCCATTACGTTGT F	CCT → GCT
	Ts2631_P23A_ R	ACAACGTAATGGATAGCCGTTAGCCGTACCCG R	
Ts2631_P35A	Ts2631_P35A_ F	CACACGGCGGGGGCGGAGAACCAAA F	CCG → GCG
	Ts2631_P35A_ R	TTTGGTTCTCCGCCCCGCCGTGTG R	
Ts2631_P40A	Ts2631_P40A_ F	CCGGAGAACCAAACCGCCGAAGCGATAAAAC F	CCC → GCC
	Ts2631_P40A_ R	GTTTTATCGCTTCGGCGTTTTGGTTCTCCGG R	
Ts2631_R45A	Ts2631_R45A_ F	CAAACCCCCGAAGCGATAAAAGCCTACCACGAGG A	CGC → GCC
	Ts2631_R45A_ R	TCCTCGTGGTAGGCTTTTATCGCTTCGGGGTTTG R	
Ts2631_R51A	Ts2631_R51A_ F	ACGAGGAGGCCGCGGGGTGGCCCC F	CGG → GCG
	Ts2631_R51A_ R	GGGGCCACCCGCGGCCTCCTCGT R	

Ts2631_W53A	Ts2631_W53A _F	GAGGCCCGGGGGCGCCCATATCGG	TGG → GCG
	Ts2631_W53A _R	CCGATATGGGGCGCCCCCGGGCCTC	
Ts2631_P73A	Ts2631_P73A F	GGTGTACAAAACGCTCGCGAATAACGCCGTACC	CCG → GCG
	Ts2631_P73A R	GGTACGGCGTTATTTCGCGAGCGTTTTGTACACC	
Ts2631_P78A	Ts2631_P78A F	CCCGAATAACGCCGTAGCTATTTGCGTTAGGGA	CCT → GCT
	Ts2631_P78A R	TCCCTAACGCAAATAGCTACGGCGTTATTCGGG	
Ts2631_R82A	Ts2631_R82A F	ACGCCGTACCTATTTGCGTTGCGGAGTTAACCCCT GTTTC	AGG → GCG
	Ts2631_R82A R	GAAACAGGGTTAAACTCCGCAACGCAAATAGGTA CGGCGT	
Ts2631_P86A	Ts2631_P86A F	GCGTTAGGGAGTTTAAACGCTGTTTCCATTTGTGTG	CCT → GCT
	Ts2631_P86A R	CACACAAATGGAAACAGCGTTAAACTCCCTAACG C	
Ts2631_W102 A	Ts2631_W102 A_F	ATTTTTCAGCAGGTGTGGCGCCTGATGACGCTCCA G	TGG → GCG
	Ts2631_W102 A_R	CTGGAGCGTCATCAGGCGCCACACCTGCTGAAAA AT	
Ts2631_P103A	Ts2631_P103A _F	AGCAGGTGTGTGGGCTGATGACGCTCC	CCT → GCT
	Ts2631_P103A _R	GGAGCGTCATCAGCCACACACCTGCT	
Ts2631_P107A	Ts2631_P107A _F	CCTGATGACGCTGCAGGATGGCGGG	CCA → GCA
	Ts2631_P107A _R	CCCGCCATCCTGCAGCGTCATCAGG	
Ts2631_W109 A	Ts2631_W109 A_F	GCCTGATGACGCTCCAGGAGCGCGGGCTCTA	TGG → GCG
	Ts2631_W109 A_R	TAGAGCCC CGCTCCTGGAGCGTCATCAGGC	
Ts2631_R110A	Ts2631_R110A _F	CGCTCCAGGATGGGCGGCTCTATGGGAG	CGG → GCG

	Ts2631_R110A _R	CTCCCATAGAGCCGCCCATCCTGGAGCG	
Ts2631_W113 A	Ts2631_W113 A_F	AGGATGGCGGGCTCTAGCGGAGTTGAAGCAGG	TGG → GCG
	Ts2631_W113 A_R	CCTGCTTCAACTCCGCTAGAGCCCCGCCATCCT	
Ts2631_P124A	Ts2631_P124A _F	CCCTAGCAAAAGCGTATGCTAAGGCGCTTTTTGTA	CCT → GCT
	Ts2631_P124A _R	TACAAAAAGCGCCTTAGCATACGCTTTTGCTAGGG	
Ts2631_P136A	Ts2631_P136A _F	CTGCACAAAAACCTTGTAGCCACAGAATGCCCTG G	CCC → GCC
	Ts2631_P136A _R	CCAGGGCATTCTGTGGCTACAAGGTTTTTGTGCAG	
Ts2631_P140A	Ts2631_P140A _F	ACCCACAGAATGCGCTGGGCGGTTGAC	CCT → GCT
	Ts2631_140A_ R	GTCAACCGCCCAGCGCATTCTGTGGGT	
Ts2631_R142A	Ts2631_R142A _F	CAGAATGCCCTGGGGCGTTGACCTGGGAAC	CGG → GCG
	Ts2631_R142A _R	GTTCCAGGTCAACGCCCCAGGGCATTCTG	
Ts2631_W145 A	Ts2631_W145 A_F	CCTGGGCGGTTGACCGCGGAACTGATACAGAG	TGG → GCG
	Ts2631_W145 A_R	CTCTGTATCAGTTCCGCGGTCAACCGCCCAGG	
Ts2631_R150A	Ts2631_R150A _F	CTGGGAACTGATACAGGCGAAGGGGGGAGGTGG	AGG → GCG
	Ts2631_R150A _R	CCACCTCCCCCTTCGCCTGTATCAGTTCCCAG	
LytA_27_F_ M487W_Y492 W	LytA_27_F_ M487W_Y492 W_F	CCGTACACAGTGGCCGGAAGCACAGTGGAAATAGT TGGT	ATG → TGG TAT → TGG
	LytA_27_R_ M487W_Y492 W_R	ACCAACTATTCCACTGTGCTTCCGGCCACTGTGTA CGG	
Lyc2_M97W_ K102W	Lyc2_M97W_K 102W_F	GGGTGAAACCTGGCCGGAAGTTCAGTGGCAGGCA ATTG	ATG→T GG

Lyc2_M97W_K	CAATTGCCTGCCACTGAACTTCCGGCCAGGTTTCA
102W_R	CCC

3.5 Antybiotyki

3.5.1 Ampicylina (A&A Biotechnology)

3.5.2 Chloramfenikol (Merck)

3.5.3 Tetracyklina (Merck)

3.6 Podłoża mikrobiologiczne

Podłoża autoklawowano przez 20 minut w 121°C, 1 atmosfera nadciśnienia. Podłoże TM autoklawowano dwukrotnie w odstępie cztero-godzinnym. Sposób przygotowania pożywki do hodowli *Clostridium acetobutylicum* opisano w podpunkcie 3.6.8.

3.6.1 Lysogeny Broth (LB)

10 g	Pepton C (A&A Biotechnology)
5 g	Ekstrakt drożdżowy (Graso)
5 g	NaCl

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.6.2 Lysogeny Broth Agar (LA)

10 g	Pepton C (A&A Biotechnology)
5 g	Ekstrakt drożdżowy (Graso)
5 g	NaCl
15 g	Agar

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.6.3 Sole Nitsch'a

0,5 mL	H ₂ SO ₄
2,20 g	MnSO ₄ ·5H ₂ O
0,50 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O
0,50 g	H ₃ BO ₃
0,016 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O
0,025 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
0,046 g	CoCl ₂ ·6H ₂ O

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.6.4 Sole Castenholz'a

1 g	Kwas nitrylooctowy
0,6 g	CaSO ₄ x 2 H ₂ O
1 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,08 g	NaCl
6,89 g	KNO ₃
1,11 g	Na ₂ HPO ₄
10 mL	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
10 mL	Sole Nitsch'a

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.6.5 TM pH 7,2

4 g	Polipepton (Roth)
2 g	Ekstrakt drożdżowy (Graso)
1 g	NaCl
10 mL	Sole Castenholz'a

Sypkie składniki uzupełniono wodą do 1000 mL i wyjałowiono. Sole Castenholza dodawano bezpośrednio przed dodaniem bakterii do pożywki.

3.6.6 TSB (*ang. Tryptic soy broth, Oxoid*)

30 g	TSB
------	-----

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.6.7 TSA

30 g	TSB
15 g	Agar

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.6.8 Pożywka *Clostridium acetobutylicum* (do hodowli *C. felsineum*) – pożywka 411

DSMZ (<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-794>)

200 g	Ziemniaki (obrane, umyte i pocięte na plasterki)
2 g	Węglan wapnia
6 g	D-glukoza
0,5 g	L-cysteina

Najpierw zmieszano ziemniaki z węglanem wapnia i autoklawowano przez 20 min w 121°C. Następnie filtrowano, dodano resztę składników, wodę do 1000 mL i doprowadzono pH do 6,8.

3.6.9 Pożywka *Clostridium acetobutylicum* z agarem

200 g	Ziemniaki (obrane, umyte i pocięte na plasterki)
2 g	Węglan wapnia
6 g	D-glukoza
0,5 g	L-cysteina
15 g	Agar

Najpierw zmieszano ziemniaki z węglanem wapnia i autoklawowano przez 20 min w 121°C. Następnie filtrowano, dodano resztę składników, wodę do 1000 mL i doprowadzono pH do 6,8.

3.6.10 Pożywka SOB pH 6,7-7,0

2%	Trypton (BD, USA)
0,5%	Ekstrakt drożdżowy (Graso Biotech, Polska)
10 mM	Chlorek sodu (BioShop, Kanada)
2,5 mM	Chlorek potasu (Eurochem, Polska)
10 mM	Heksahydrat chlorku magnezu (Research Organics Inc., USA)
10 mM	Heptahydrat siarczanu magnezu (Research Organics Inc., USA)

Uzupełniono wodą do 500 mL.

3.7 Bufory oraz roztwory

3.7.1 Bufor TB

10 mM	PIPES (Merck, USA)
15 mM	Chlorek wapnia (POCH, Polska)
250 mM	Chlorek potasu (Eurochem, Polska)
55 mM	*Tetrahydrat chlorku manganu (II) – (Merck, Niemcy)

*dodano po ustaleniu pH do 6,7

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.2 Bufory do oczyszczania białek

3.7.2.1 2 x NPi, pH 8,0

100 mM	Diwodorofosforan sodu (Merck, Niemcy)
600 mM	NaCl

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.2.2 NPi10 – bufor fosforanowy

500 mL 2 x NPi pH 8,0
10 mM Imidazol
5% Glicerol (BioShop, Kanada)

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.2.3 NPi20 – bufor fosforanowy

500 mL 2 x NPi pH 8,0
20 mM Imidazol
5% Glicerol

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.7.2.4 NPi150 – bufor fosforanowy

500 mL 2 x NPi pH 8,0
150 mM Imidazol
5% Glicerol

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

Bufory fosforanowe, z których nie korzystano podczas pracy z systemem ÄKTA zawierały 0,1% Triton X-100.

3.7.2.5 Bufor MES do regeneracji złoża

20 mM MES pH 5,0
300 mM NaCl

3.7.2.6 Bufor KPi (fosforanowo – potasowy), pH 8,0

1 M Diwodorofosforan potasu
1 M Monowodorofosforan potasu

Uzupełniano wodą do 1000 mL.

3.7.3 Bufory do dializy białek

Nazwa buforu	Skład buforu
A	20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM chlorek sodu, 10% glicerol
B	20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM chlorek sodu, 50% glicerol
C	10 mM fosforan potasu, pH 8,0, 150 mM siarczan amonu, 10% glicerol
D	PBS, pH 7,4, 10% glicerol

E	20 mM HEPES, pH 7,4
F	50 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , pH 7,2, 150 mM NaCl

3.7.4 Bufory wykorzystane do określenia optimum aktywności białek

Stężenie	Bufor	pH
10 mM	Octan sodu (Eurochem, Polska)	3,0
	Octan sodu	4,0
	Octan sodu	5,0
	MES (Sigma-Aldrich, Niemcy)	5,5
	MES	6,0
	MES	6,5
	KPi	7,0
	KPi	7,5
	KPi	8,0
	Tris-HCl (SERVA, Niemcy)	8,5
	Glicyna (Eurochem, Polska)	9,0
	CAPS (Eurochem, Polska)	9,5
	Glicyna	10,0
	Wodorofosforan sodu (Sigma-Aldrich, Niemcy)	11,0
	Wodorofosforan sodu	12,0

3.7.5 Bufor Laemmli

125 mM	Tris-HCl (SERVA, Niemcy)
10%	β-merkaptoetanol (SERVA, Niemcy)
5%	Dodecylsulfat sodu (Bioshop, Kanada)
20%	Glicerol (100%) (Stanlab, Polska)
0,02%	Błękit bromofenolowy (POCH, Polska)
	Woda destylowana

3.7.6 10 x stężony Barwnik Coomassie błękit brylantowy G

2,5 g	Coomassie błękit brylantowy G
100 mL	Kwas octowy

450 mL	Metanol
350 mL	Woda destylowana

3.7.7 1 x stężony Barwnik Coomassie błękit brylantowy G

50 mL	10 x stężony Barwnik Coomassie błękit brylantowy G
20 mL	Kwas octowy
50 mL	Woda

3.7.8 Odbarwiacz

100 mL	Kwas octowy
200 mL	Metanol
800 mL	Woda destylowana

3.7.9 Bufor do elektroforezy agarozowej

3.7.9.1 TBE

90 mM	Tris (SERVA, Niemcy)
2 mM	EDTA
0,55% (w/v)	Kwas borowy

3.7.10 Bufory do rozdzielania białek w żelu poliakrylamidowym

3.7.10.1 Bufor do elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

30 g	Tris (SERVA, Niemcy)
14,4 g	Glicyna
1 g	SDS

Uzupełniono wodą do 1000 mL

3.7.10.2 Bufor elektrodowy górny, pH 6,8

500 mM	Tris
0,5%	SDS

3.7.10.3 Bufor elektrodowy dolny pH 8,8

1,5 M	Tris
0,4%	SDS

3.7.10.4 Bufory do elektroforezy w żelu trycynowym

3.7.10.4.1 Bufor trycynowy

363 g	Tris, pH 8,45
0,3 g	SDS

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.10.4.2 Bufor elektrodowy dolny

24,22 g	Tris, pH 8,9
---------	--------------

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.10.4.3 Bufor elektrodowy górny

12 g	Tris
18 g	Trycyna
1 g	SDS

Uzupełniono wodą do 1000 mL.

3.7.11 Bufor do przygotowania substratów bakteryjnych

50 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	Chloroform

Odczynniki mieszano w stosunku 1:1.

3.7.12 Bufory do testu redukcji zmętnienia

Skrót literowy	Skład buforu do reakcji
A	20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl, 10% glicerol
B	1 × PBS (10 mM bufor fosforanowy, 0,27 mM chlorek potasu, 137 mM chlorek sodu), pH 7,4
C	10 mM KPi, pH 8,0, 500 mM NaCl
D	10 mM KPi, pH 8,0
E	20 mM HEPES pH 7,4

3.7.13 Bufory do testu wiązania peptydoglikanu

3.7.13.1 Bufor Tris-maleinowy, pH 6,5

330 mL	1M Tris (SERVA)
200 mL	1 M Kwas maleinowy (Sigma-Aldrich, Niemcy)

Jeśli było to potrzebne, to doprowadzano pH do 6,5 i dopełniono wodą do 1000 mL.

3.7.13.2 Bufor T-M

1 M	Chlorek sodu
10 mM	Bufor Tris-maleinowy

3.7.13.3 Bufor do rozpuszczenia osadu

62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
2%	SDS
19%	Glicerol
5%	B-merkaptioetanol

3.8 Żele do elektroforezy

3.8.1.1 Żel do elektroforezy agarozowej

50,0 mL	Bufor TBE
0,7 g	Agaroza
3,5 μ L	Bromek etydyny/ Simply Safe

3.8.2 Żel do elektroforezy SDS-PAGE

3.8.2.1 Żel zagęszczający 4,4 % do elektroforezy SDS-PAGE

0,375 mL	Roztwór akrylamidów/ bisakrylamidów 30/0,8
0,625 mL	Bufor elektrodowy górny
1,55 mL	Woda
12,5 μ L	10% Siarczan amonu (APS)
7,5 μ L	TEMED (VWR, USA)

3.8.2.2 Żel rozdzielający 12,5%, 15% do elektroforezy SDS-PAGE

2,55/ 4,8 mL	Roztwór akrylamidów/ bisakrylamidów 30/0,8
1,55/ 2,4 mL	Bufor elektrodowy górny
2,05/ 2,4 mL	Woda
20 μ L	10% Siarczan amonu (APS)
10 μ L	TEMED

3.8.2.3 Żel do elektroforezy trycyna-SDS-PAGE

3.8.2.3.1 Żel zagęszczający 4%

1,25 mL	Roztwór akrylamidów/ bisakrylamidów 30/0,8
0,6 mL	Bufor trycynowy
3,125 mL	Woda
12,5 µL	10% Siarczan amonu (APS)
7,5 µL	TEMED (VWR, Stany Zjednoczone)

3.8.2.3.2 Żel rozdzielający 10%

2,0 mL	Roztwór akrylamidów/ bisakrylamidów 30/0,8
1,65 mL	Bufor trycynowy
0,5 mL	Glicerol
0,8 mL	Woda
20 µL	10% Siarczan amonu (APS)
10 µL	TEMED

3.9 Pozostałe odczynniki

- 3.9.1 Albumina bydlęca (BSA, EURx, nr kat. E4020-01)
- 3.9.2 Anhydraza węglanowa (GE Healthcare, Wielka Brytania, nr kat. 28403841C)
- 3.9.3 Et-OH 96% (POCH, Polska)
- 3.9.4 1 M izopropylotiogalaktopiranozyd (IPTG, SERVA)
- 3.9.5 Glukoza (Eurochem, Polska)
- 3.9.6 H₂O ultraczysta (Merck, Niemcy)
- 3.9.7 CaCl₂ (POCH, Polska)
- 3.9.8 Zestaw do oczyszczania plazmidowego DNA Plasmid mini AX (A&A Biotechnology) nr kat. 010-50
- 3.9.9 Zestaw do oczyszczania plazmidowego DNA Plasmid mini (A&A Biotechnology) nr kat. 020-250
- 3.9.10 Polimeraza PFU (Eurx, nr kat. EK1114-02)
- 3.9.11 Ditiotretitol (DTT, SERVA, Niemcy)
- 3.9.12 Złoże TALON (Takara, nr kat. 635504)
- 3.9.13 Kolumny HiTrap TALON 1 mL (Cytiva, nr kat. 28953766)
- 3.9.14 Worek dializacyjny (SERVA, Niemcy, nr kat. 44110.02)
- 3.9.15 Odczynnik Bradford (Sigma-Aldrich, nr kat. B6916)

- 3.9.16 Wzorzec masowy DNA - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisherScientific, nr kat. SM0312)
- 3.9.17 Białkowy wzorzec masowy - PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (ThermoFisherScientific, nr kat. 26616)
- 3.9.18 96-dółkowe płytki z nieprzywierającą powłoką (Corning, USA) nr kat. 3641
- 3.9.19 96-dółkowe płytki (Falcon, USA) nr kat. 351172
- 3.9.20 Pronaza E (Merck, Niemcy)
- 3.9.21 Dimetylosulfotlenek (DMSO) (Serva, Niemcy)
- 3.9.22 Kapilary do pomiarów temperatury topnienia (nr kat. PR-C002)
- 3.10 Programy komputerowe
 - 3.10.1 BioEdit
 - 3.10.2 DAS – predykcja domen transmembranowych (<https://tmdas.bioinfo.se/>)
 - 3.10.3 Seaview 5.0.5
 - 3.10.4 SnapGene
 - 3.10.5 Statistica 13
 - 3.10.6 UCSF Chimera 1.18
- 3.11 Metody obliczeniowe
 - 3.11.1 Do predykcji trójwymiarowych modeli białek
 - 3.11.1.1 Omegafold
 - 3.11.1.2 Modeller
 - 3.11.1.3 RoseTTAFold
 - 3.11.1.4 DeepFold
 - 3.11.1.5 RGN2
 - 3.11.1.6 AlphaFold2/AlphaFold3
 - 3.11.1.7 ESMFold
 - 3.11.1.8 Metagenomicatlas
 - 3.11.1.9 Phyre2
 - 3.11.1.10 RGN2
 - 3.11.1.11 Protenix
 - 3.11.1.12 Chai-1
 - 3.11.2 Do predykcji wpływu mutacji na białko
 - 3.11.2.1 DDMut
 - 3.11.2.2 DDGUN
 - 3.11.2.3 mCSM

- 3.11.2.4 DynaMut2
- 3.11.2.5 MuPro
- 3.11.2.6 I-Mutant 2.0

4. Metody

4.1 Metody bioinformatyczne

4.2 Filogeneza

Za pomocą Foldseek¹⁰⁸ znaleziono strukturalne homologii endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG) i spośród nich czternaście struktur białek rozpoznających peptydoglikan (PGRP) będących amidazami N-acetylmuramylo-L-alaninowymi zostało pobranych z Protein Data Bank (RCSB PDB). Porównanie sekwencji po nałożeniu struktur przeprowadzono przy użyciu programu UCSF Chimera 1.18. Następnie zidentyfikowano sekwencje homologiczne przy użyciu algorytmu BLASTp oraz przeprowadzono wielokrotne porównanie sekwencji przy użyciu serwera Clustal Omega (Clustal Omega < EMBL-EBI). Na podstawie dopasowania strukturalnego przeprowadzono ręczną korektę dopasowania przy użyciu programu Seaview 5.0.5 (Materiały 3.10.3). Po wyrównaniu, ze względu na dużą zmienność obserwowaną w regionach N- i C-końcowych analizowanych białek, do dalszej analizy wykorzystano tylko region kodujący domenę amidazy N-acetylmuramylo-L-alaniny (amidase_2). Jako punkt odniesienia wybrano fragment endolizyny Ts2631 z faga vB_Tsc2631, obejmujący pozycje aa od 20 do 142 (z pełnej długości 1–156 aa).

4.3 Modelowanie białek

Do predykcji trójwymiarowych (3D) modeli białek wykorzystano metody wymienione w Tab. 4. Przewidywanie struktury wykonano w większości na platformach dostępnych w sieci z wyjątkiem Omegafold i Modeller, gdzie przewidywanie struktury przeprowadzono lokalnie. Jeśli metoda pozwalała na zmianę parametrów modelowania to stosowano wybór, który pozwalał na dokładniejsze modelowanie. Następnie modele poddano optymalizacji łańcuchów bocznych w programie GalaxyRefine¹⁰⁹. Szablony do weryfikacji modeli zostały wybrane za pomocą serwisów internetowych Foldseek i AlphaFill¹¹⁰, albo DALI¹¹¹. Dodatkowo modele weryfikowano przy wykorzystaniu bazy danych pSSdb¹¹² (Protein Secondary Structure Database). Modele analizowano przy wykorzystaniu oprogramowania UCSF Chimera 1.18¹¹³. Predykcje wprowadzonych mutacji w strukturalnych homologach pochodzenia mezofilnego

endolizyny Ts2631 zostały wykonane za pomocą: DDMut¹¹⁴, DDGun¹¹⁵, mCSM¹¹⁶, DynaMut2¹¹⁷, I-mutant 2.0¹¹⁸ oraz MUpro¹¹⁹.

Tab. 4. Metody wykorzystane do tworzenia modeli przestrzennych białek.

Nazwa białka	Metody
K11gp3.5	ESMFold/ MetagenomicAtlas ¹²⁰ , AlphaFold 2 ¹²¹ , OmegaFold ¹²² , RoseTTAFold ¹²³ , RGN2 ¹²⁴ , DeepFold ¹²⁵ , Phyre2 ¹²⁶ , Modeller ¹²⁷
Lyc2, O3I, LytA_27, LytO	ESMFold/ MetagenomicAtlas, AlphaFold 3 ¹²⁸ , Omegafold, RoseTTAFold, DeepFold, Phyre2, Modeller, Protenix ¹²⁹ , Chai-1 ¹³⁰

4.4 Określenie i normalizacja czynnika B

W programie UCSF Chimera 1.18. określono czynnik B dla pojedynczych struktur. Następnie znormalizowano je do jednej skali, by móc je między sobą porównać. Dla każdej struktury wyznaczono średni czynnik B dla każdej reszty jako średnią wartości atomów, z których się składa. Obliczenia wykonano przy użyciu autorskiego skryptu w języku Python wykorzystującego interfejs programowania aplikacji (API) programu Chimera.

$$B_r = \frac{1}{N_r} \sum_{i=1}^{N_r} B_i$$

gdzie B_r to średni czynnik dla reszty r ; N_r – liczbę atomów w reszcie; B_i wartość czynnika B dla i -tego atomu.

Uzyskany zestaw wartości B_r został znormalizowany dla każdej struktury w celu usunięcia różnic w skali. Normalizację przeprowadzono poprzez obliczenie średniej (μ) i odchylenia standardowego (σ) wartości B_r w całym modelu 3D i przekształcenie każdej wartości według wzoru:

$$Z_r = \frac{B_r - \mu}{\sigma}$$

Gdzie Z_r to znormalizowany czynnik B dla reszty r .

W przypadku, w którym σ było bliskie 0 przyjmowano wartość 1, w celu uniknięcia błędu dzielenia przez 0. Otrzymane wartości Z_r opisują względną ruchliwość reszt niezależnie od skali czynnika B. Dla reszt homologicznych między analizowanymi strukturami białek obliczono różnice wartości Z_r według wzoru:

$$\Delta Z = Z_r^{(A)} - Z_r^{(B)}$$

Gdzie $Z_r^{(A)}$ i $Z_r^{(B)}$ oznaczają znormalizowane wartości kolejno dla białka A i białka B. Wyniki znormalizowanych wartości czynnika B zapisano bezpośrednio w atrybutach reszt w Chimere, co pozwoliło zwizualizować te wartości po ich pokolorowaniu. Im wyższa była wartość czynnika B, tym kolor był bardziej niebieski a im niższa tym kolor był bardziej czerwony.

4.5 Analiza statystyczna

Statystyka została wykonana za pomocą testu *t*-Studenta w programie Statistica 13. W przypadku braku jednorodności wariancji stosowano poprawkę z niezależną estymacją wariancji *Cohrana-coxa*.

4.6 Mutageneza miejscowo-specyficzna i synteza genów

W przypadku endolizyny Ts2631 dokonano substytucji wszystkich tryptofanów, prolin i arginin na alaninę. Mutagenezę miejscowo-specyficzną przeprowadzono według instrukcji QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent technologies). Wszystkie zaprojektowane startery znajdują się w Tab. 3 (Materiały 3.4). Produkty PCR zostały poddane rozdziałowi w żelu agarozowym (Metody 4.7) w celu potwierdzenia zajścia reakcji. Otrzymane warianty po izolacji DNA zestawem do izolacji DNA plazmidowego Plasmid mini AX, bądź Plasmid mini (Materiały 3.9.8, 3.9.9) zostały poddane weryfikacji poprzez sekwencjonowanie w zewnętrznej firmie (Genomed S.A.). Po otrzymaniu potwierdzenia o uzyskaniu właściwego konstruktu wprowadzano go do szczepu ekspresyjnego *E. coli* BL21(DE3)pRARE lub *E. coli* BL21(DE3) poprzez transformację chemiczną (Metody 4.10).

Syntezę genów umieszczonych w Tab. 2 zlecono firmie BioCat GmbH (Heidelberg, Niemcy), które później za pomocą transformacji chemicznej (Metody 4.10) wprowadzono do szczepów *E. coli* DH5a w celu przechowania plazmidu oraz szczepu ekspresyjnego *E. coli* BL21(DE3).

4.7 Elektroforeza w żelu agarozowym

Najpierw przygotowano żel do elektroforezy agarozowej (Materiały 3.8.1.1). Odważoną agarozę zalano buforem TBE (Materiały 3.7.9.1) a następnie przegotowano. Po przestudzeniu dodawano bromek etydyny lub Simply Safe (EURx. Polska), wylewano i po włożeniu grzebienia tworzącego studzienki pozostawiono do przestygnięcia.

Zastygnięty żel umieszczano w aparacie do elektroforezy i zalewano buforem TBE. Jako wzorzec masowy stosowano GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Materiały 3.9.16), nakładano 2 μ L do studzienki w żelu. Następnie próbki mieszano z buforem obciążającym i наносzono na żel. Elektroforezę prowadzono do rozciągnięcia się ścieżek w żelu przy 90V.

4.8 Przygotowanie komórek super-kompetentnych

Hodowlę nocną *E. coli* DH5 α odmłodzono w stosunku 1:100 w pożywce SOB (Materiały 3.6.10) o objętości 250 mL. Następnie hodowlę inkubowano w 18°C i po uzyskaniu OD₆₀₀ ~0,5 schłodzono w lodzie przez 10 minut. Następnie przeniesiono ją do probówek typu Falcon i wirowano (5 000 \times g, 10 min, 4°C). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 80 mL schłodzonego buforu TB (Materiały 3.7.1) i inkubowano przez 10 minut w lodzie. Powtórzono wirowanie, supernatant odrzucono, a osad komórkowy zawieszono w 20 mL zimnego TB. Do zawiesiny komórek dodano dimetylosulfotlenek (DMSO, Materiały 3.9.21) o stężeniu końcowym 7%. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w lodzie jeszcze przez 10 minut, a następnie poporcjowano do probówek typu Eppendorf. Ostatecznie zamrożono je w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C.

4.9 Przygotowanie komórek kompetentnych

Do 20 mL pożywki LB dodano 2 mL nocnej hodowli bakteryjnej *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pRARE, *E. coli* C41(DE3) lub *E. coli* C43(DE3). Po osiągnięciu OD₆₀₀ ~0,3-0,4 hodowlę zostawiono w lodzie na 30 minut. Następnie odwirowano (5000 \times g, 4°C, 10 min.), a osad delikatnie zawieszono w 20 mL zimnego CaCl₂ (Materiały 3.9.7). Pozostawiono na lodzie przez 10 minut i odwirowano w tych samych warunkach. Następnie supernatant zlano a osad zawieszono w 800 μ L zimnego CaCl₂ i 200 μ L 50% glicerolu. Komórki kompetentne przechowywano w -80°C.

4.10 Transformacja chemiczna

Do 100 μ L komórek kompetentnych dodano 1 μ L plazmidu kodującego odpowiedni gen białka. Kontrolę stanowiły komórki bez dodanego plazmidu. Po 20 minutach próby przenoszono do termobloku o temperaturze 42°C na 1,5 minuty. Po tym czasie przenoszono je na 3 minuty do lodu. Następnie dodawano do nich 500 μ L LB (Materiały 3.6.1) i inkubowano przez 45 minut w 37°C. Następnie komórki transformowane jak i kontrolne (bez plazmidu) wysiewano na podłoże LA (Materiały 3.6.2) z odpowiednim antybiotykiem, bądź bez niego.

4.11 Nadprodukcja i oczyszczanie

Bakterie *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* C41(DE3), bądź *E. coli* C43(DE3) z plazmidem ekspresyjnym kodującym gen odpowiedniego białka hodowano z ampicyliną (w przypadku pRARE dodawano jeszcze chloramfenikol) w 30°C bądź 37°C w 50, 250 lub 1000 mL LB (Materiały 3.6.1) do osiągnięcia OD₆₀₀ 0,4 - 0,5. Następnie indukowano je 0,1, 0,5 lub 1 mM (stężenie końcowe) izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozydem (IPTG, Materiały 3.9.4), czasem z dodatkiem 1 mM (stężenie końcowe) ditiotreitolu (DTT, Materiały 3.9.11). Hodowlę kontynuowano w 18°C, 30°C lub 37°C. Po 4 (hodowle w 30°C i 37°C) lub 16 (hodowle w 18°C) godzinach od zaindukowania hodowli przerywano nadprodukcję. Przed indukcją pobrano 1 mL hodowli oraz 0,5 mL po jej zakończeniu w celu weryfikacji efektywności nadprodukcji za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (Metody 4.14). Komórki bakteryjne osadzano za pomocą wirowania (9 000 × g, 20 min., 4°C), supernatant zlewano a osad zawieszano w buforze NPi10 (Materiały 3.7.2.2). Osad przechowywano w -80°C do momentu oczyszczania.

Po rozmrożeniu osad zawieszano w buforze NPi10 (Materiały 3.7.2.2), by następnie poprzez sonikację (średnio 30 powtórzeń po 10 s o amplitudzie 12 μm) degradowano ścianę komórkową bakterii. Uzyskany lizat bakteryjny został poddany wirowaniu (10 000 × g, 30 min., 4°C), by oddzielić resztki bakteryjne (osad) od białek (supernatant). Nadprodukowane białko zostało oczyszczone metodą powinowactwa jonów metali na złożu kobaltowym Talon (Materiały 3.9.12, 3.9.13) jednym z dwóch sposobów: za pomocą zautomatyzowanej procedury ÄKTA, albo według manualnej procedury producenta dla oczyszczania w kolumnie polipropylenowej z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). W przypadku manualnego oczyszczania białka łączono ze złożem przez 20 minut, albo przez noc. Złoża płukano z użyciem buforów NPi10 i czasem dodatkowo NPi20 (Materiały 3.7.2.3.). Białka eluowano buforem NPi150 (Materiały 3.7.2.4.). Białka dializowano do różnych buforów, których skład podano w podrozdziale Materiały 3.7.3. Stężenia białek określano za pomocą metody Bradford (Metody 4.13.). Przechowywano je do dalszej analizy w -80°C uprzednio mroząc je w ciekłym azocie. Jakość i efektywność oczyszczania weryfikowano na podstawie przeprowadzonej elektroforezy SDS-PAGE (Metody 4.14.).

4.12 Sączenie molekularne (SM)

Białko LytO, a dokładniej domena amidazowa tego białka oraz jej wariant zostały dodatkowo oczyszczone za pomocą SM, do którego wykorzystano Äkta Pure 25 system (GE

healthcare). Do tego celu użyto kolumnę Superdex75 10/300 GL (Cytiva), która została skalibrowana przy wykorzystaniu następujących białek: aprotynina 10 kDa, rubonukleaza A 13,7 kDa, anhydraza węglanowa 29 kDa, albumina jaja kurzego 44 kDa i konalbumina 75 kDa. Kolumnę zrównoważono buforem F (Materiały 3.7.3.). Na przygotowaną kolumnę nanoszono próbkę w ilości 2 mL i zakresie stężeń między 1 mg/mL a 2 mg/mL. Szybkość przepływu w kolumnie ustawiono na 0,5 mL/min. Cała procedura przebiegała w temperaturze około 8°C a przepływ białka monitorowano przy długości fali 280 nm.

4.13 Metoda Bradford do oznaczenia stężenia białek

Przygotowano płytkę 96-dołkową (Materiały 3.9.19.), BSA (Materiały 3.9.1.) w stężeniach 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL i 1,4 mg/mL, odczynnik Bradford (Materiały 3.9.15.), wodę (stanowiła tło dla BSA), bufor, do którego białko było dializowane (stanowił tło dla białka, którego stężenie określano) oraz białko. Na płytkę dodano 125 μ L odczynnika Bradford a do niego dodawano po 2,5 μ L wody, białka, bądź buforu w trzech powtórzeniach. Jeśli białko, którego stężenie określano charakteryzowało się intensywniejszą barwą niż najwyższe stosowane stężenie BSA wtedy rozcieńczano je i ponownie mieszano z odczynnikiem. Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm w czytniku płytek Sunrise (TECAN). Stężenie białka określano w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną z odczytanej absorbancji zależnej od stężenia BSA.

4.14 Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Najpierw przygotowano żel poliakrylamidowy zaczynając od żelu rozdzielającego (Materiały 3.8.2.2), po którego zastygnięciu przygotowano zagęszczający (Materiały 3.8.2.1) i umieszczono w nim grzebień. Próbki do elektroforezy z nadprodukcji najpierw wirowano (18 000 \times g, 3 min.) i osad zawieszano w 50 μ L NPi10 (Materiały 3.7.2.2) Z kolei większość próbek z oczyszczania białek pobierano w objętości 50 μ L, z wyjątkiem lizatu (10 μ L próbki mieszano z 40 μ L NPi10), osadu (pobierano odrobinę i zawieszano w 50 μ L NPi10) i supernatantu (pobierano 20 μ L i zawieszano w 30 μ L NPi10). W dalszych krokach próbkami zajmowano się identycznie. Dodawano do nich 5 μ L buforu Laemmli (Materiały 3.7.5.) a następnie gotowano przez 5 minut w łaźni wodnej, poddano wirowaniu (18 000 \times g, 10 s) i wytrząsano przez 3 – 5 s na wytrząsarce typu vortex. W studzienkach żelu umieszczano przygotowane próbki. W przypadku nadprodukcji było to 7 μ L przed nadprodukcją i 4 μ L po nadprodukcji, natomiast w przypadku oczyszczania wszystkie próbki nakładano po 2 μ L

z wyjątkiem próbki z supernatantem, którą nakładano w ilości 3 μ L. W celu oceny wielkości prążków nałożono 2 μ L białkowego wzorca masowego (Materiały 3.9.17.). Rozdział prowadzono w buforze do elektroforezy SDS-PAGE (Materiały 3.7.10.1.) przy napięciu prądu 180 V do momentu wyjścia barwnika. Po rozdziale elektroforetycznym żel barwiono w 1 x stężonym Barwniku Coomassie błękit brylantowy G (Materiały 3.7.7) a następnie odbarwiano w odbarwiaczu (Materiały 3.7.8.) do momentu odbarwienia się tła.

4.15 Aktywność lityczna białek

4.15.1 Przygotowanie substratów

W celu zmierzenia aktywności litycznej białek został przeprowadzony test redukcji zmętnienia (TRZ). Substraty Gram-ujemnych komórek bakteryjnych wykorzystanych w teście zostały uprzednio przygotowane w celu zwiększenia dostępności peptydoglikanu. Hodowle komórkowe bakterii, niezależnie od budowy ściany komórkowej, były hodowane do późnej fazy logarytmicznego wzrostu (OD_{600} 0,7-0,8) a następnie wirowane ($5\ 000 \times g$, $4^{\circ}C$, 15 min.). Supernatant zlewano, a osad komórek Gram-dodatnich zawieszano w 10 mM buforze fosforanowo potasowym pH 8,0 (KPi). Zawiesinę komórek znów wirowano i zawieszano w mniejszej objętości tego samego buforu. Osady komórek Gram-ujemnych po wirowaniu zostały potraktowane mieszaniną buforu 50 mM Tris- HCl, pH 7,7 z chloroformem (1:1) (Materiały 3.7.11) i po zawieszeniu w roztworze inkubowano je w temperaturze pokojowej przy bardzo delikatnym wytrząsaniu przez 45 minut. Po tym czasie zawiesinę komórek wirowano w analogicznych warunkach jak za pierwszym razem. Supernatant zlewano a osad płukano buforem KPi, jedno- lub dwukrotnie wirując ($5\ 000 \times g$, $4^{\circ}C$, 15 min.). Na końcu osad zawieszano w małej objętości KPi (300 mL hodowli początkowej w 10 mL KPi). Substraty Gram-dodatnich komórek bakteryjnych (potrzebne do określenia spektrum działania niektórych enzymów w tej pracy) zostały przygotowane podobnie, z pominięciem inkubacji w mieszaninie Tris-HCl-chloroform. Wszystkie substraty komórkowe porcjowano do próbek i przechowywano w $-80^{\circ}C$ do dalszych eksperymentów.

4.15.2 Test redukcji zmętnienia

Substraty doprowadzano do $OD_{600} \sim 1,0$ zawieszając w odpowiednim buforze (Tab. 5). Białka doprowadzano do odpowiedniego stężenia (Tab. 5). a następnie ogrzewano przez 15 minut w określonej temperaturze, bądź zostawiano na lodzie. Następnie przenoszono 190 μ L zawiesiny komórek do płytki 96-dołkowej z nieprzywierającą powłoką (Materiały 3.9.18) i dodawano do niej 10 μ L białka o odpowiednim stężeniu (Tab. 5). Próbki dodawane były

w trzech powtórzeniach. Następnie prowadzono reakcję w czytniku płytek w warunkach określonych w Tab. 5. Kontrolę negatywną stanowił bufor, w jakim było zawieszone białko, który dodano do substratu. Aktywność lityczna została wyliczona według następującego wzoru:

$$[\Delta OD600 \text{ próbki (z białkiem)} - \Delta OD600 \text{ (z samym buforem)}] / \text{początkowe OD600}.$$

Tab. 5. Warunki reakcji każdego badanego białka w teście redukcji zmętnienia.

Nazwa białka	Skrót literowy	Skład buforu do reakcji	Stężenie białka w reakcji	Warunki reakcji
Ts2631	A	20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl, 10% glicerol	5 µg/mL	60°C, 15 min.
K11gp3.5	B	PBS, pH 7,4	5 µg/mL	37°C, 30 min.
LytO	C	10 mM KPi, pH 8,0, 500 mM NaCl	62,5 µg/mL	37°C, 30 min.
Domena amidazowa LytO	D	10 mM KPi, pH 8,0	125 µg/mL	37°C, 60 min.
Lyt_A27	E	20 mM HEPES pH 7,4	25 µg/mL	37°C, 15 min.
Lyc2	F	10 mM KPi, pH 8,0	100 µg/mL	37°C, 120 min.

4.15.3 Określanie optymalnych warunków dla aktywności litycznej białek

Aby określić optymalne warunki aktywności litycznej białek testowano ich zdolność lizy określonych substratów bakteryjnych w buforach o różnych zakresach stężeń NaCl (0 – 1000 mM), pH (3,0 – 12,0) oraz temperatur (4°C – 100°C). Bufory o różnej wartości pH oraz pozostałe do określenia aktywności białek podane są w podrozdziałach Materiały 3.7.3 i 3.7.4.

4.15.4 Określenie spektrum działania białek

Spektrum działania białek określono przeciw bakteriom znajdującym się w Tab. 1 z numerami 1 – 7, 13 – 15, 17 – 20. Bakterie tlenowe oraz fakultatywne beztlenowce najpierw wysiewano na podłoże stałe LA (Materiały 3.6.2). Następnie pobierano pojedynczą kolonię bakterii i hodowano je w pożywce LB (Materiały 3.6.1) w 37°C z wytrząsaniem.

Bakterie beztlenowe (Tab. 1, 5 – 7) hodowano w komorze do hodowli bakterii beztlenowych (DG250 Workstation; Don Whitley Scientific Ltd., Bingley, West Yorkshire, Wielka Brytania) w 37°C. *C. sporogenes* oraz *C. beijerinckii* hodowano najpierw na podłożu stałym TSA (Materiały 3.6.7), a następnie pobierano z nich kolonie, które przenoszono do

pożywki płynnej TSB (Materiały 3.6.6). *C. felsineum* hodowano najpierw na podłożu z agarem do hodowli *Clostridium acetobutylicum* (Materiały 3.6.9), a następnie przenoszono do pożywki płynnej (Materiały 3.6.8.). Bakterie beztlenowe hodowano bez wytrząsania.

Następnie bakterie przygotowano do testów tak samo jak w Metodzie 4.15.1 hodując je najpierw w odpowiednich warunkach. Następnie przeprowadzono TRZ zgodnie z Metodą 4.15.2.

4.16 Nano różnicowa fluorymetria skaningowa (nanoDSF)

Białka wirowano ($10\ 000 \times g$, 15 min.) w celu pozbycia się bąbelków powietrza, które mogłyby zakłócić pomiar. Następnie doprowadzono je do temperatury pokojowej. Próbki umieszczano w kapilarach Prometheus standard w objętości około $10\ \mu\text{L}$, które umieszczano na szynie urządzenia Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies). Ułożone kapilary zostały zaklejone silikonem, by zapobiec wyparowaniu próbek. Pomiar prowadzono w zakresie temperatur od 20°C do 110°C co 1°C . Wzrastająca fluorescencja pochodząca od reszt tryptofanu i tyrozyny była mierzona w falach o długości $330\ \text{nm}$ i $350\ \text{nm}$. Bazując na zmianach intensywności fluorescencji w funkcji temperatury obliczany był stosunek F_{350}/F_{330} za pomocą oprogramowania PR.ThermControl. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie temperatury topnienia (T_m) danego białka. W przypadku białek: K11gp3.5 oraz LytA_27 wartości pochodzące z pierwszej pochodnej zostały pomnożone przez -1 w celu poprawy czytelności wykresu.

4.17 Izolacja Peptydoglikanu

Peptydoglikan izolowano z *T. thermophilus* HB8. Hodowlę nocną bakterii odmłodzono w stosunku 1:2000 i hodowano w 60°C przez noc do osiągnięcia $OD_{600} \sim 0,7$ w pożywce TM (Materiały 3.6.5) w 6 kolbach o pojemności $250\ \text{mL}$. Następnie odwirowano hodowlę ($5\ 000 \times g$, 18°C , 10 min.), supernatant zlano a osad z każdej kolby zawieszono w $3\ \text{mL}$ PBS (Merck, Niemcy). Do zawiesin dodano po $6\ \text{mL}$ gotującego się 6% SDS (Merck, Niemcy). Zawiesinę bakteryjną inkubowano gotując ją z wytrząsaniem ($187\ \text{rpm}$, 100°C , 3 godziny). Po tym czasie temperaturę wyłączano, a próbki zostawiano na noc z wytrząsaniem. Następnego dnia temperatura została ponownie włączona na 2 godziny, w celu rozpuszczenia SDS, który się wytrącił. Następnie próbki zebrano do dwóch probówek polipropylenowych (Thermo Scientific Nalgene, $30\ \text{mL}$) w objętości po $27\ \text{mL}$. Próbki zrównoważono i wirowano ($50\ 000 \times g$, 18°C , 20 min., Beckman Optima XPN0199, rotor 70.Ti, Niemcy). Po wirowaniu ostrożnie zlano supernatant, a osad zawieszono w $20\ \text{mL}$ ultraczystej wody. Wirowanie powtórzono jeszcze

dwa razy w tych samych warunkach, a po ostatnim wirowaniu osad zwieszono w 2,7 mL 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 0,06% NaCl. Próbkę poporcjowano po 900 μ L do 1,5 mL probówek typu Eppendorf (łącznie 6 probówek). Następnie po aktywacji pronazy E (Materiały 3.9.20) w stężeniu 1 mg/mL (60°C, 30 min.) dodano ją w ilości 100 μ L do każdej probówki i inkubowano przez 2 godziny w 60°C. Następnie zatrzymano reakcję poprzez dodanie po 200 μ L 6% SDS do próbek i inkubowano je dalej przez 30 min. w 100°C. Wszystkie próbki zebrano do 1 probówki z polipropylenu kopolimerowego, ultrawirovano i płukano w 20 mL wody, tak jak to opisano wyżej, do momentu usunięcia SDS (brak bąbli powietrza). Po ostatnim wirowaniu próbki zawieszono w 10 mL ultraczystej wody i rozdzielono po 100 μ L do probówek typu Eppendorf. Wyizolowany PGN wysuszono i przechowywano w -80°C.

4.18 Test wiązania peptydoglikanu

PGN zawieszono w 1 mL buforu T-M (Materiały 3.7.13.2) i przez 30 min. inkubowano w lodzie. Następnie PGN dokładnie wymieszano i odwirowano (12 500 \times g, 4°C, 5 min.) i ponownie zawieszono w buforze T-M. Czynność tę powtórzono jeszcze 3-krotnie na końcu zawieszając osad w 650 μ L buforu T-M. Następnie 150 μ L rozpuszczonego PGNu zmieszano z 3,6 μ g endolizyny Ts2631, bądź jej wariantu substytucyjnego i 100 μ L buforu T-M. Kontrolę negatywną stanowiła anhydraza węglanowa (CA, Materiały 3.9.2). Białko to nie wiąże peptydoglikanu i powinno zostać we frakcji białek niezwiązanych z peptydoglikanem. Przygotowane mieszaniny inkubowano w 4°C przez 30 min. Po tym czasie przerwano inkubację i odwirowano próbki (12 500 \times g, 4°C, 5 min.). Supernatant zachowano, a osad przepłukano 4-krotnie buforem T-M, by usunąć pozostałości niezwiązanych z PGNem białek w warunkach wymienionych wyżej. Po ostatnim wirowaniu przepłukany PGN wyodrębniono buforem: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 19% glicerolu, i 5% β -merkaptioetanolu. Do każdej próbki dodano po 6 μ L buforu Laemmli (Materiały 3.7.5), zagotowano przez 5 minut po czym odwirowano (10 s, 10 000 \times g) i zworteksowano. Supernatant i osad PGNu poddano rozdzielaniu w żelu Trycyna-SDS-PAGE. Żel trycynowy (Materiały 3.8.2.3) przygotowano według schematu opisanego w podrozdziale Metody 4.14. Skład żeli znajduje się w podrozdziale Materiały 3.8.2.3.1 oraz 3.8.2.3.2. Po wykonaniu żeli nałożono całą objętość próbek do pojedynczych studzienek. Rozdział w żelu zagęszczającym prowadzono przy napięciu 30 V, a po przejściu próbek do żelu rozdzielającego napięcie zwiększono do 90 V. Żel barwiono przez noc w 1 x stężonym Barwniku Coomassie błękit brylantowy G (Materiały 3.7.7.).

4.19 Spektroskopia dichroizmu kołowego

Białka zostały zawieszane w buforze C (Materiały 3.7.3) i doprowadzone do stężenia 0,15 mg/mL (7,14 μ M). Dane zostały zebrane za pomocą spektropolarymetru do dichroizmu kołowego JASCO J-815, gdzie długość ścieżki wyniosła 1 mm. Widoczny wynik pomiaru spektrum dichroizmu kołowego jest średnią z sześciu skanów.

5. Wyniki i dyskusja

5.1 Analiza filogenetyczna endolizyny Ts2631

W pracy nad endolizyną Ts2631, która ukazała się w 2019 r. wykazano, że w sekwencji endolizyny Ts2631 występuje więcej tryptofanów, arginin i prolin w porównaniu z białkami mezofilnymi¹⁰⁷. Zastanowiło mnie, jakie jeszcze różnice można znaleźć pomiędzy sekwencją aa i strukturą przestrzenną endolizyny Ts2631 a homologicznymi białkami mezofilnymi. Strukturalnym homologiem pochodzenia mezofilnego jaki wykorzystano do określenia struktury przestrzennej endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG) w poprzednich badaniach był lizozym faga T7 (PDB: 1LBA). Zależało mi na tym, żeby znaleźć jak najbardziej podobne i dobrze opisane białko pochodzenia mezofilnego, a jednocześnie wirusowego, z którym mogłabym porównać endolizynę Ts2631. W czasie kiedy podjęłam się zbadania mechanizmu stabilności termicznej endolizyny Ts2631, od momentu, kiedy określono jego strukturę w bazie danych PDB mogły pojawić się kolejne białka, które byłyby do tego białka homologiczne pod względem struktury.

W pierwszej kolejności skoncentrowałam się na wyszukaniu białek wykazujących podobieństwo do endolizyny Ts2631. Celem pracy było znalezienie białka pochodzącego z bakteriofaga mezofilnego w celu porównania struktury oraz sekwencji aa obu białek.

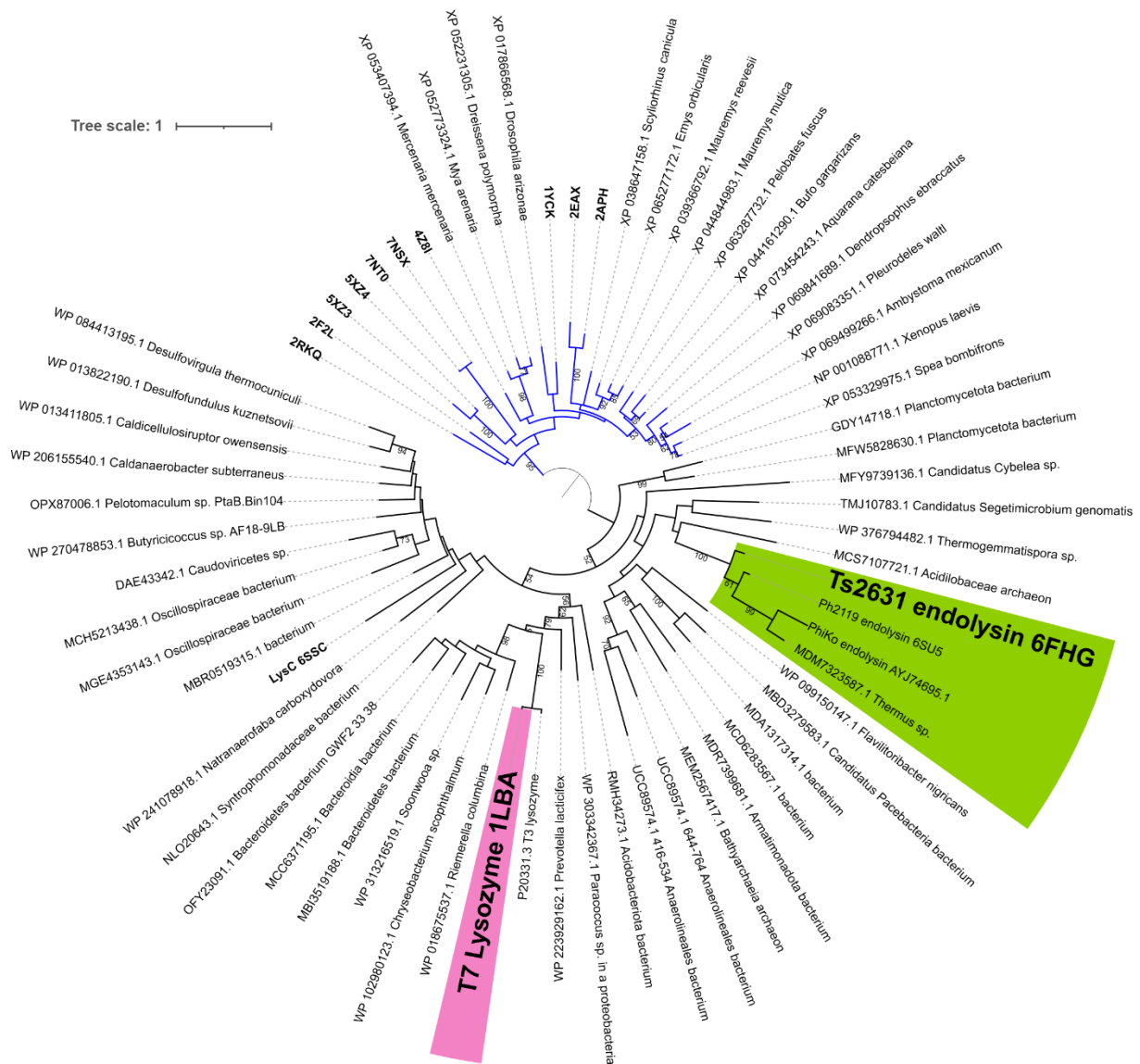
We współpracy z dr hab. Marcinem Górniakiem, Wydział Biologii, UG, stworzyłam drzewo filogenetyczne opierające się na sekwencji domeny rozpoznającej peptydoglikan (PGRP) endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG)¹⁰⁷. Wynik topologiczny ujawnił dwa główne kłady, o wsparciu 95, którym odpowiadają dwie różne linie ewolucyjne (Ryc. 9). W kładzie oznaczonym niebieskimi liniami reprezentowane są taksony eukariotyczne, a w drugim znajduje się wiele taksonów bakteryjnych, niewiele archeonów oraz podzbiór sekwencji wirusowych. Wewnątrz obu kładów widać niskie wsparcie (słabe rozdzielenie), co może wskazywać na gwałtowne rozdzielenie się linii potomnych w krótkim czasie ewolucyjnym, albo niewystarczający sygnał filogenetyczny, aby lepiej rozdzielić relacje.

W kładzie z białkami eukariotycznymi znajdują się też białka będące strukturalnymi homologami endolizyny Ts2631 (co wykazałam za pomocą Foldseek). Obejmują one: *Drosophila melanogaster* PGRP-LB (PDB: 7NT0), *D. melanogaster* PGRP-LB (PDB: 7NSX), *Apis mellifera* PGRP-SA (PDB: 5XZ3), Bumblebee PGRP-SA (PDB: 5XZ4), ludzki PGRP-IaC (PDB: 2APH), ludzki PGRP-IβC (PDB: 2EAX), ludzki PGRP-S (PDB: 1YCK), *Branchiostoma belcheri tsingtauense* BbtPGRP3 (PDB: 4Z8I), kompleks domeny zewnątrzkomórkowej PGRP-LCa i PGRP-LCx u *D. melanogaster* (PDB: 2F2L) oraz PGRP-SD i *D. melanogaster* (PDB: 2RKQ). Z kolei w drugim kładzie odróżnia się kilka kluczowych podstruktur. Kład o silnym wsparciu (100) obejmuje taksony termofili, w tym oprócz endolizyny Ts2631, trzy białka: endolizynę Ph2119 z vB_Ph2119 (PDB: 6SU5), endolizynę PhiKo z vB_phiKo (GenBank: AYJ74695.1) i białko z *Thermus* sp. (GenBank: MDM7323587.1). Dwie z tych endolizyn: Ph2119 i PhiKo zostały już opisane przez grupę badawczą Profesora Tadeusza Kaczorowskiego⁶⁶ oraz Profesor Magdaleny Płotki²⁵. Natomiast białko z *Thermus* sp. zostało dodane do GenBanku 22.06.2023 r. i w dniu, kiedy piszę tę pracę nie ukazały się żadne wyniki opisujące to białko. W klastrze bakteryjnym znajduje się podgrupa o niskim wsparciu, w tym: lizozym T7 (PDB: 1LBA) i amidaza LysC z *Clostridium intestinale* (PDB: 6SSC). Takie niskie wsparcie może wynikać z dużego zróżnicowania sekwencji lub zjawiska horyzontalnego transferu genów kodujących enzymy rozkładające ściany komórkowe¹³¹.

Zastanawiałam się, które z dwóch białek, LysC, czy lizozym T7, wybrać do dalszej analizy porównawczej z endolizyną Ts2631. Zarówno białko LysC, jak i lizozym T7 są opisane w literaturze, chociaż lizozym T7 znacznie lepiej. Amidaza LysC, jest prawdopodobnie autolizyną, czyli białkiem pochodzenia bakteryjnego¹³². Wykorzystując Foldseek można porównać ze sobą podobieństwo w topologii struktur białkowych za pomocą wskaźnika TM-score (*ang. Template Modelling score*). Jeśli wartość wynosi poniżej 0,5 oznacza to, że białka nie są do siebie podobne, a im bliżej 1, tym białka są bardziej podobnie sfałdowane. W przypadku takiego porównania struktur przestrzennych endolizyny Ts2631 i białka LysC TM-score wyniósł 0,88. Z kolei lizozym T7, to amidaza pochodząca od bakteriofaga T7, która pełni funkcję endolizyny¹³³. Porównanie endolizyny Ts2631 z lizozymem T7 w narzędziu Foldseek pokazało, że TM-score wynosi 0,82.

Ze względu na to, że lizozym T7 pełni biologiczną funkcję najbardziej podobną do endolizyny Ts2631, jest bardzo dobrze opisanym białkiem w literaturze, ze znaną strukturą,

a TM-score nie różnił się znacząco od LysC, to właśnie lizozym T7 wybrałam jako strukturalny homolog pochodzenia mezofilnego, do dalszej analizy porównawczej.



Ryc. 9. Drzewo filogenetyczne wykonane na podstawie sekwencji endolizyny Ts2631 odpowiadającej domenie rozpoznającej peptydoglikan (PGRP). Zielonym kolorem zaznaczono kład obejmujący sekwencje białek najbardziej spokrewnionych z endolizyną Ts2631, które są białkami termofilnymi. Kolorem różowym zaznaczono lizozym faga T7, który jest strukturalnym homologiem endolizyny Ts2631 i reprezentantem białek mezofilnych. Niebieskimi liniami wyróżniono kład zawierający białka eukariotyczne; 10 z nich o podanych numerach PDB stanowi najbliższe eukariotyczne homologi strukturalne endolizyny Ts2631.

5.2 Analiza porównawcza endolizyny Ts2631 oraz lizozymu faga T7

Zdecydowałam się porównać ze sobą białka: endolizynę Ts2631 i lizozym T7 skupiając się na ich I-, II- i III-rzędowych strukturach. Na podstawie struktury przestrzennej lizozymu T7

(PDB: 1LBA) metodą podstawienia molekularnego została wyznaczona wcześniej struktura endolizyny Ts2631¹⁰⁷.

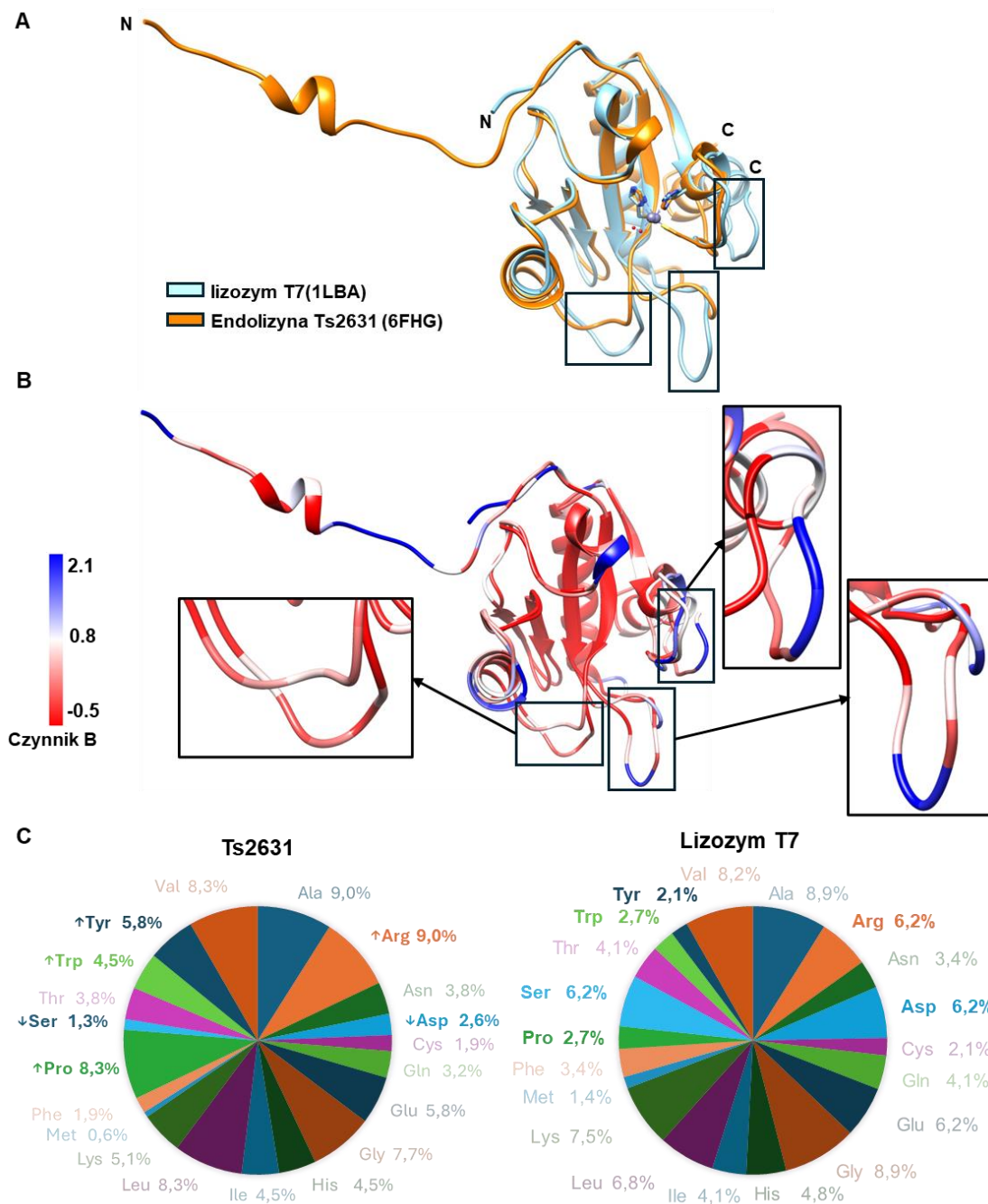
Oba białka mimo bardzo podobnej budowy i dobrego dopasowania (Ryc. 10A) nie wykazują wysokiego podobieństwa sekwencji aa, bo identyczność wynosi zaledwie 31,2% (porównania dokonano w NCBI BLASTp).

Oba białka zbudowane są z podobnej ilości struktur II-rzędowych, z tym, że endolizyna Ts2631 posiada unikatowe 20-aa wydłużenie na N-końcu z dodatkową α -helisą. Wyraźnie zauważalne są 3 dłuższe pętle lizozymu T7 (Ryc. 10B). Wiadomym jest, że krótsze pętle są istotne w stabilności termicznej białek¹³⁴. Pętle posiadają też zwykle wysoki czynnik B, który dostarcza informacje między innymi na temat dynamiki konformacyjnej danego regionu białka, dostępności rozpuszczalnika, czy stabilności termicznej^{135,136}. Postanowiłam porównać ze sobą czynniki B obu białek. Niższa wartość czynnika B wskazywała na region o obniżonej dynamice konformacyjnej, tutaj oznaczony kolorem czerwonym (Ryc. 10B). Natomiast im czynnik B był wyższy, tym dane miejsce charakteryzowało się większą dynamiką konformacyjną, co na Ryc. 10B zaznaczyłam kolorem niebieskim. W przypadku dwóch pętli (środkowej i skrajnie prawej) widoczny jest wyraźny kolor niebieski na pętlach lizozymu T7, co świadczy o wysokiej wartości czynnika B. Natomiast w przypadku pętli zaznaczonej po lewej stronie na Ryc. 10B nie widać istotnie dużej różnicy w czynniku B i w przypadku obu białek jest on dość niski, na co wskazuje bardziej czerwony kolor.

W literaturze podobne obserwacje w przypadku białek termofilnych i ich strukturalnych homologów poczyniono w przypadku kilku innych białek. W badaniach nad enzymami z rodziny lipaz porównywano do siebie struktury przestrzenne czterech różnych enzymów: lipazy psychrofilnej EstS z *Shewanella halifaxensis*, lipazy psychrotolerancyjnej EstP z *Pseudomonas* sp. B11-1, lipazy mezofilnej EstB z *Burkholderia thailandensis* i lipazy termofilnej Est2 z *Alicyclobacillus acidocaldarius* (PDB: 1EVQ¹³⁷). Białka te wykazują identyczność sekwencji aa na poziomie 38 – 47%. Za pomocą dynamiki molekularnej porównywano ruchomość pętli, gdzie wskaźnikiem dynamiki konformacyjnej jest fluktuacja średniokwadratowa (ang. *Root Mean Square Fluctuation*, RMSF). W przypadku białka termofilnego (Est2) jedna z pętli, L2 jest o jeden aa krótsza w porównaniu do reszty białek. Zlokalizowana na N-końcu pętla wykazała niższe wartości RMSF przy niższej temperaturze, czyli obniżoną dynamikę konformacyjną, a wyższe przy rosnącej temperaturze, czyli zwiększyła swoją dynamikę konformacyjną, w porównaniu do pozostałych białek. Autorzy

sugerują, że N-końcowa część może odpowiadać za stabilność termiczną w tej rodzinie enzymów¹³⁸.

Z kolei w pracy porównującej ze sobą białko termofilne będące represorem argininowym ArgR z *Geobacillus stearothermophilus* (PDB: 1B4B) i jego mezofilny odpowiednik z *E. coli* K12 (PDB: 1XXA) wskazano na różnice w długości pętli i porównano tam wartości czynnika B. Na pętlach wartości te były niższe w białku termofilnym, niż mezofilnym wskazując na niższą dynamikę konformacyjną w tych regionach. Te białka także wykazały niewielkie podobieństwo sekwencji aminokwasowych (identyczność wynosiła 31%), a strukturalnie wykazywały wysoką homologię¹³⁹.



Ryc. 10. Porównanie częstości występowania aminokwasów oraz struktur przestrzennych endolizyny Ts2631 i lizozyimu T7. **A** – nałożone na siebie struktury endolizyny Ts2631 (kolor pomarańczowy) oraz lizozyimu faga T7 (kolor niebieski). W nawiasach obok nazw białek znajdują się numery PDB. Po nałożeniu struktur uzyskano wartość średniokwadratowego odchylenia (*ang. Root Mean Square Deviation, RMSD*) równą 0,853 Å dla rdzenia białka (103 pary C α po odfiltrowaniu par atomów przekraczających próg dopasowania), natomiast dla całego dopasowania (137 par) RMSD wyniosło 4,425 Å. Prostokątami zaznaczono wyraźnie różniące się od siebie pętle występujące w strukturach obu białek. **B** – struktury tych białek z naniesionymi wartościami czynnika B. Regiony o niższych wartościach tego czynnika oznaczono kolorem czerwonym, natomiast wyższych kolorem niebieskim. Wartości czynnika B zostały znormalizowane do wspólnej skali w celu ich porównania. **C** –

porównanie występowania poszczególnych aminokwasów w sekwencji endolizyny Ts2631 i lizozymu T7.

Ze względu na to, że poszczególne aminokwasy także mogą mieć znaczenie w stabilności termicznej białka przyjrzałam się bliżej strukturze I-rzędowej i procentowemu udziałowi aminokwasów w całej sekwencji endolizyny Ts2631, jak i lizozymu T7 (Ryc. 10C).

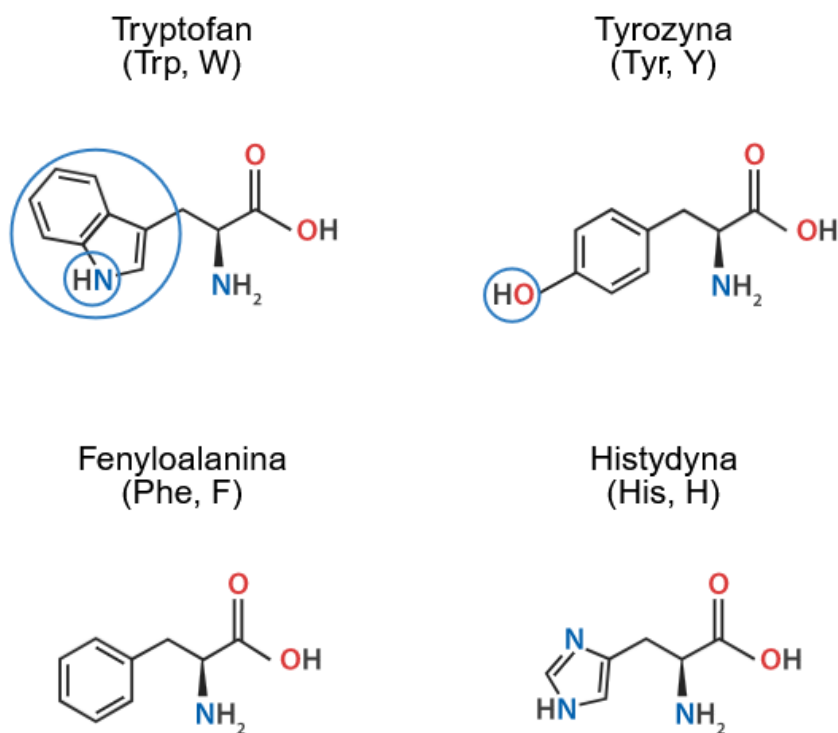
Procent występowania większości aminokwasów nie różnił się znacznie pomiędzy tymi dwoma białkami, ale ilości kilku aminokwasów, wymienionych poniżej, znacznie od siebie odbiegały.

Argininy, proliny i aa aromatyczne, a w szczególności tryptofany, ze względu na swoje właściwości omówione szczegółowo we Wstępie (podrozdział 1.7), są istotnymi aminokwasami z punktu widzenia stabilności termicznej białek. Zwróciłam więc na nie szczególną uwagę podczas porównywania sekwencji białek. Długość sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 to 156 aminokwasów. W sekwencji jest 7 tryptofanów, 13 prolina oraz 14 arginin. Tylko dwie argininy (R64 i R67) oraz dwie proliny (P54 i P140) są aminokwasami konserwowanymi w sekwencji endolizyny Ts2631.

5.2.1 Występowanie aminokwasów aromatycznych

W sekwencji termostabilnej endolizyny 16,7% stanowią aa aromatyczne podczas, gdy u mezofilnego lizozymu jest to 13,0%. Zawartość aminokwasów, takich jak tryptofan (Trp, W) i tyrozyna (Tyr, Y) jest w endolizynie Ts2631 wyższa i odpowiada kolejno 4,5% i 5,8%, a w sekwencji lizozymu T7 to 2,7% oraz 2,1%. Można zauważyć natomiast mniejszą zawartość fenyloalaniny (Phe, F) u endolizyny (1,9%) niż u lizozymu (3,4%). Z kolei w przypadku histydyny (His, H) nie zaobserwowałam istotnej różnicy (4,5% vs 4,8% odpowiednio u endolizyny Ts2631 i lizozymu T7). Aa aromatyczne są niezwykle istotne w hydrofobowych rdzeniach białek termofilnych. Różnice w częstości ich występowania w białkach termofilnych i mezofilnych można wytłumaczyć analizując funkcję oraz budowę tych aminokwasów (Ryc. 11.). Większa ilość tryptofanów może wynikać z obecności podwójnego pierścienia indolowego, dzięki któremu może utworzyć więcej stabilizujących oddziaływań π . W jego pierścieniu znajduje się grupa -NH, która jest donorem w wiązaniu wodorowym^{140,141}. Ta dodatkowa grupa -NH nie występuje u fenyloalaniny, ani tyrozyny. Tyrozyna natomiast posiada pojedynczy pierścień benzenowy i dodatkową grupę hydroksylową (-OH), która bierze udział w wiązaniach wodorowych. To także daje jej przewagę nad fenyloalaniną^{142,143}. Fenyloalanina jest aminokwasem hydrofobowym i aromatycznym, tak jak dwa wcześniejsze aa, dzięki czemu

może uczestniczyć w oddziaływaniach hydrofobowych i $\pi - \pi$. Ma ona jednak małą powierzchnię interakcji (pojedynczy pierścień benzenowy) i nie może utworzyć tylu wiązań co tryptofan i tyrozyna, dlatego w termofilnych białkach nie jest faworyzowana. Jest to częsty wzór, który stanowi uniwersalny wzorzec adaptacyjny białek termofilnych.



Ryc. 11. Schemat przedstawia wzory strukturalne tryptofanu, tyrozyny, feniloalaniny i histydyny. Niebieskim kółkiem zaznaczono pierścień indolowy oraz grupę -NH tryptofanu i grupę hydroksylową tyrozyny, która znajduje się w pierścieniu benzenowym (rycina stworzona w programie BioRender).

Histydyna natomiast ma mały pierścień indolowy (5-członowy, imidazolowy), jej średnia energia oddziaływania w układzie $\pi - \pi$ w roztworze wodnym jest najniższa ze wszystkich aminokwasów aromatycznych i wynosi około -3,0 kcal/mol do -4 kcal/mol (w stanie deprotonacji, czyli pH powyżej ~6,0) w zależności od tego, z którym aminokwasem wchodzi w interakcję. W stanie protonacji ($\text{pH} \leq 6$) może brać udział w oddziaływaniach kation - π , które są silniejsze od oddziaływań $\pi - \pi$, a także w tworzeniu mostków solnych. Histydyna może nie być istotna w stabilności termicznej, ze względu na jej zależność od pH i niestabilność w tworzeniu oddziaływań, natomiast często jest częścią centr katalitycznych białek¹⁴⁴.

5.2.2 Występowanie prolin

Z kolei prolina występowała w ilości 8,3% i 3,4% kolejno w sekwencji endolizyny Ts2631 i lizozymu faga T7. W endolizynie Ts2631 jest w sumie 13 prolin, z czego 4 znajdują się na początku α -helisy, a 9 znajduje się na pętlach. W lizozymie faga T7 obecne są tylko 4 proliny, z czego dwie znajdują się w tej samej pozycji co u endolizyny Ts2631, a dwie pozostałe znajdują się blisko centrum aktywnego pozostając w niewielkiej odległości od tych występujących w endolizynie Ts2631. Prolina, dzięki swojej budowie jest sztywnym aminokwasem. Obecność proliny prowadzi do zmniejszenia entropii w głównym łańcuchu, co minimalizuje ryzyko rozfałdowania w wyższej temperaturze. Odpowiada za ograniczoną ruchomość elementów białka, co usztywnia i stabilizuje je w całości¹⁴⁵. Obecność tej reszty może wpływać na obniżenie czynnika B w danym regionie, szczególnie w pętlach co jest szczególnie istotne w pętlach znajdujących się często blisko powierzchni. Jest to też aminokwas hydrofobowy i u termofilów obserwuje się oddziaływania hydrofobowe pomiędzy innymi aminokwasami zarówno na powierzchni jak i w rdzeniu białka. Obserwuje się, że częstość występowania proliny rośnie w kierunku psychrofile \rightarrow mezofile \rightarrow termofile¹⁴⁵.

5.2.3 Występowanie dodatnio naładowanych aminokwasów

W sekwencjach obu białek widoczne są różnice między ilością arginin, gdzie w endolizynie stanowią one 9,0% a w lizozymie 6,2%. Arginina jest dodatnio naładowanym aminokwasem, tak jak lizyna, której u lizozymu faga T7 jest więcej (7,5%) niż u termostabilnej endolizyny (5,1%). Sumując zawartość dodatnio naładowanych aminokwasów można zauważyć ich podobną ilość, gdzie u endolizyny to 14,1% a w lizozymie 13,7% (histrydyny nie brałam pod uwagę, gdyż jest dodatnio naładowana tylko w pH kwaśnym^{144,146}). Można przypuszczać, że w wyniku adaptacji do wysokiej temperatury u stabilnej termicznie endolizyny doszło do wzbogacenia sekwencji aminokwasowej o argininy. Główną przyczyną może być obecność grupy guanidynowej argininy mającej wyższą wartość pKa (około 13,8 – 13,9¹⁴⁷) niż grupa aminowa lizyny (około 10,4 – 10,5^{148,149}), co oznacza, że łatwiej utrzyma swój dodatni ładunek w zmiennych warunkach (np. przy wyższej temperaturze). Łańcuch boczny argininy jest też krótszy o jedną grupę metylową w porównaniu do lizyny, co może wpływać na mniej oddziaływań z rozpuszczalnikiem, co z kolei jest korzystne w ekstremalnych warunkach⁸⁵. Lizyna ma możliwość przyjęcia większej liczby możliwych konformacji niż arginina, co może wpływać na zwiększoną entropię układu^{85,150}. W przypadku argininy zatem istnieje niższe prawdopodobieństwo przejść strukturalnych, co w wysokiej temperaturze skutkowałoby denaturacją. Grupa guanidynowa argininy może tworzyć liczne interakcje elektrostatyczne

i wiązania wodorowe, które stabilizują układ⁸⁵. Argininy też są preferowane w oddziaływaniach kation- π , ponieważ ich grupa guanidynowa tworzy silniejsze oddziaływania niż grupa aminowa lizyny¹⁵¹. Lizyna może odgrywać inne role stabilizujące. Istnieją przesłanki, które potwierdzają, że w genomach niektórych organizmów hipertermofilnych preferencja występowania arginin wynika bezpośrednio z wysokiej zawartości par zasad (pz) GC w sekwencji nukleotydowej (wszystkie kodony argininy rozpoczynają się od CG). Jednak nie jest to reguła, ponieważ zauważono także, że w proteomach termofilów może występować przewaga lizyn nad argininami^{97,150}. Jedne z nowszych badań pokazują, że termofile bogate są w pz AT jako dwie pierwsze zasady kodonu a G/C występują często w trzeciej pozycji kodonu (60%)¹⁵². Jest to z pewnością złożony mechanizm zależny od innych oddziaływań, jakie występują w danym białku.

5.2.4 Występowanie ujemnie naładowanych aminokwasów

Warto od razu wspomnieć o kwasie asparaginowym (Asp, D), który występuje w znacznie mniejszej ilości u endolizyny stanowiąc 2,6% sekwencji, podczas gdy u lizozymu T7 6,2%. Jest to ujemnie naładowana reszta, podobnie jak kwas glutaminowy (Glu, E), który z kolei występuje w podobnej ilości w obu białkach. Łańcuchy boczne dodatnio naładowanych aminokwasów z ujemnie naładowanymi tworzą mostki solne. Sumując jednak ilość ujemnie naładowanych aminokwasów w endolizynie Ts2631 zauważyłam, że jest ich o 4% mniej niż w lizozymie T7. Kwas glutaminowy ma dłuższy łańcuch boczny, w związku z czym może pozwalać na bardziej efektywne tworzenie mostków solnych i lepiej dopasować się przestrzennie, stąd w sekwencji termostabilnej endolizyny może być jej więcej niż kwasu asparaginowego. Dodatnio naładowane aa biorą też udział w oddziaływaniach z aminokwasami aromatycznymi (kation- π), które są bardziej stabilne od mostków solnych. Nie wiadomo natomiast, czy większa ilość arginin a mniejsza kwasu asparaginowego może świadczyć o tym, że w termostabilnym białku istnieje więcej oddziaływań kation- π od mostków solnych, by lepiej ustabilizować białko.

5.2.5 Występowanie seryny

Seryna (Ser), to aminokwas, który także występował rzadziej u endolizyny Ts2631 (1,3%) niż u lizozymu T7 (6,2%). Seryna jest aminokwasem polarnym, a przez dużą ilość dostępnych konformacji łańcucha bocznego sprzyja lokalnie zwiększonej dynamice konformacyjnej i większemu nieuporządkowaniu w białku. W białkach nieuporządkowanych obserwuje się większy udział hydrofilowych i nieskompensowanych naładowanych aminokwasów (dlatego

też kwasu asparaginowego w białkach termofilnych bywa mniej). W organizmach termofilnych w przeciwieństwie do mezofilnych obserwuje się mniejszy udział białek o dużym nieuporządkowaniu. W białkach uporządkowanych reszty seryny znajdują w większości na powierzchni białka^{153,154}. Tak jest w przypadku endolizyny Ts2631, gdzie jedna seryna znajduje się na pętli, a druga na początku β -nici wystawionych na zewnątrz (Ryc. S1). Zapewnia to dostęp do rozpuszczalnika, z jakim te reszty mogą oddziaływać.

5.2.6 Porównanie występowania aminokwasów między termofilnymi endolizynami a lizozymem T7

Powyższe obserwacje skonfrontowałam przyglądając się składowi procentowemu aminokwasów, które są składową białek występujących na jednej gałęzi w drzewie filogenetycznym, gdzie poza endolizyną Ts2631 znajdują się jeszcze: Ph2119, PhiKo i białko pochodzące z *Thermus* sp. (nr akcesyjny: MDM7323587.1) (Ryc. 9). Zaobserwowałam, że ilość tryptofanów i prolin w tych białkach jest zdecydowanie wyższa niż u lizozymu T7. W przypadku arginin tylko endolizyna Ph2119 posiada mniej tych reszt niż lizozym T7 jednocześnie wcale nie zawierając większej ilości lizyn. Z całą pewnością można jednak zauważyć pewną tendencję w różnicy pomiędzy zawartością poszczególnych aminokwasów w białkach mezofilnych i termofilnych. Patrząc z tej perspektywy możliwe jest, że w przypadku wymienionych białek to tryptofan i prolina mają największe znaczenie w stabilności termicznej wymienionych białek (Ryc. S2).

5.2.7 Porównanie występowania aminokwasów między endolizyną Ts2631, lizozymem T7 a białkami wirusowymi i bakteryjnymi

Przyglądając się składowi aminokwasowemu bardziej globalnie sprawdziłam, jaki rozkład występowania aminokwasów występuje w białkach wirusowych obejmujących 518 140 i bakteryjnych obejmujących zbiór 30 290 647 sekwencji aminokwasowych (Ryc. S3). Porównując ilość tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny, argininy, proliny, seryny i kwasu asparaginowego widać, że tendencja w ich występowaniu jest podobna jak w lizozymie T7. Natomiast w przypadku lizyny ten trend był nieco inny. Częstość występowania tej reszty w białkach wirusowych wyniosła 6,2%, czyli podobnie jak u lizozymu T7 (7,5), a więcej niż w endolizynie Ts2631 (5,1%). Natomiast w białkach bakteryjnych 4,2%, czyli nawet mniej niż u endolizyny Ts2631.

W białkach bakteryjnych i wirusowych często występują białka wewnętrznie nieuporządkowane. Im bardziej złożony organizm, tym więcej białek o nieuporządkowanej

strukturze. W białkach wirusowych, które są dłuższe niż 300 aa jest ich szczególnie więcej niż w białkach pochodzenia bakteryjnego. W obrębie prokariotów obfitość białek wewnętrznie nieuporządkowanych zależy od temperatury wzrostu organizmu. Ilość białek wewnętrznie nieuporządkowanych jest istotnie większa u mezofili niż u termofili. Można zaobserwować te różnice patrząc na występowanie aminokwasów z różną częstotliwością u mezofili i termofili, choć zaznacza się, że nie jest to jedyny wskaźnik definiujący wewnętrzne uporządkowanie białka. Wskazuje się, że aminokwasy takie jak: cysteina, tryptofan, izoleucyna, tyrozyna, fenyloalanina, leucyna, histydyna, czy walina promują wewnętrzne uporządkowanie w białku. Z kolei: prolina, kwas glutaminowy, seryna, glutamina, lizyna, alanina i glicyna promują nieuporządkowanie.^{153–155}. Może zaskakiwać, że prolina promuje nieuporządkowanie lecz należy zwrócić uwagę, że ma znaczenie miejsce, w którym ten aminokwas występuje¹⁵⁶. Biorąc te dane pod uwagę można było się spodziewać, że występowanie aminokwasów takich jak seryna, czy kwas asparaginowy będzie częstsze w białkach bakteryjnych i wirusowych pochodzenia mezofilnego niż w termofilnej endolizynie Ts2631. Z kolei występowanie argininy, tyrozyny, czy tryptofanu i proliny częściej będzie występować u termofilnej endolizyny Ts2631 niż w białkach mezofilnych i termofilnych.

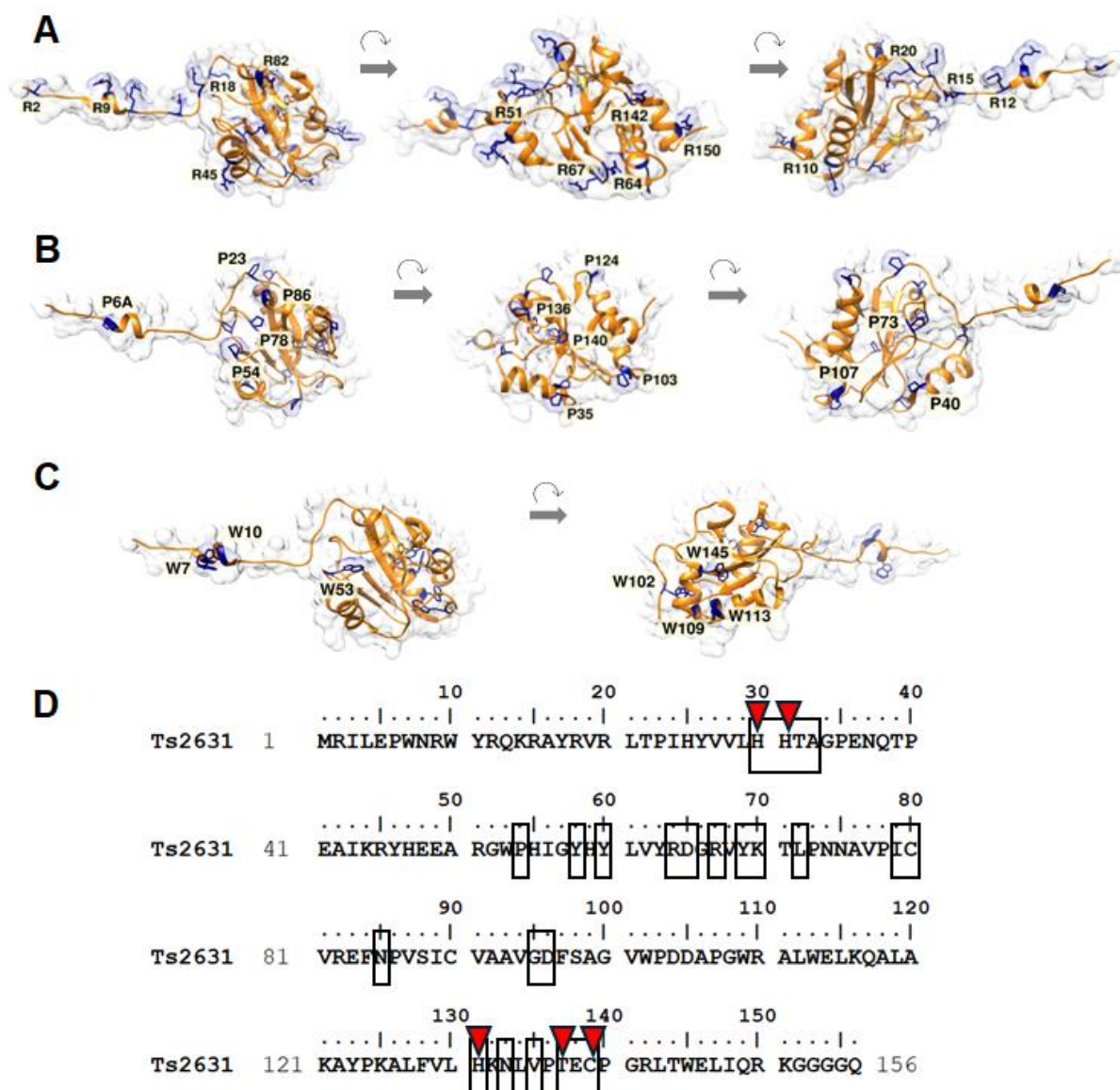
Jedne z najnowszych badań, w których przeprowadzono analizę porównawczą genomów termofili i psychrofilii w porównaniu do mezofili ukazano porównanie sekwencji genomowych 20 gatunków termofilnych, 20 psychrofilnych i 19 mezofilnych. Należy jednak zaznaczyć, że wzięto pod uwagę różnorodne gatunki, ale tylko spośród bakterii i archeonów. Wykazano tam, że w porównaniu do mezofili u termofili występuje znacznie więcej reszt tyrozyny, glutaminy i leucyny a zdecydowanie mniej cysteiny, alaniny, argininy, glutaminy, czy asparaginy¹⁵⁷. Na ten moment brakuje dużych badań porównawczych wskazujących na skład sekwencji aminokwasowej u wirusów termofilnych i mezofilnych. W przypadku wirusów termofilnych nie jest to duża grupa reprezentacyjna i na ten moment nikt jeszcze nie pokusił się o zebranie danych na temat tych białek.

Podsumowując dane dotyczące analizy sekwencji aminokwasowej zauważyłam, że zawartość termolabilnych aminokwasów, czyli seryny i kwasu asparaginowego jest niższa u endolizyny Ts2631. Natomiast zawartość takich aminokwasów jak: arginina, prolina, tryptofan i tyrozyna jest zdecydowanie wyższa. Postanowiłam skupić się na tych aminokwasach, których jest więcej i uważam, że mogłyby promować stabilność termiczną endolizyny. Nie wzięłam jednak pod uwagę wszystkich tyrozyn, a z aminokwasów

aromatycznych skupiłam się na tryptofanie, jako, że może brać udział w większej ilości oddziaływań stabilizujących białko.

5.3 Mutageneza miejscowo-specyficzna

Zdecydowałam się wykonać skan alaninowy, który polega na podstawieniu danego aminokwasu alaniną. Alanina jest małym aminokwasem, może występować zarówno w strukturach α , jak i β . Ma bardzo krótki łańcuch boczny ograniczony do tylko jednego węgla β , którego pozycja jest zależna od konformacji szkieletu polipeptydowego. Dzięki obecności węgla β i braku możliwości zbyt wielu dodatkowych oddziaływań alanina jest powszechnie akceptowana przy analizie roli poszczególnych aminokwasów w białku. Jak już wspomniałam wcześniej, biorąc pod uwagę analizy porównujące endolizynę Ts2631 z lizozymem faga T7 zdecydowałam się skupić na tych aminokwasach, których w sekwencji endolizyny Ts2631 jest więcej. Wykonano więc warianty substytucyjne, gdzie każdy tryptofan, prolinę i argininę zamieniono na alaninę (mutageneza miejscowo-specyficzna tych wariantów została przygotowana przed moim przybyciem do zespołu dr hab. Magdaleny Płotki). W ten sposób utworzono 34 warianty substytucyjne z czego 3 (P54, R64 i R67) były już przygotowane we wcześniejszych badaniach nad endolizyną. W poprzednich badaniach skupiono się na resztach konserwowanych w sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631, gdzie sprawdzano ich wpływ na aktywność lityczną oraz wiązanie z peptydoglikanem¹⁰⁷. Widok usytuowania tych reszt w strukturze przestrzennej białka przedstawiłam na Ryc. 12.



Ryc. 12. Reprezentacja powierzchni endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG). **A** - Reszty argininy, gdzie po lewej stronie przedstawione są R2, R9, R18, R45 i R82, po środku R51, R64, R67, R142 i R150 a po prawej R12, R15, R20 i R110; **B** - Reszty prolin, gdzie od lewej strony widoczne są, P6, P23, P54, P78 i P86, po środku P35, P103, P124, P136 i P140 a po prawej P40, P73 i P107; **C** - Reszty tryptofanów z widokiem po lewej stronie na W7, W10 i W53 a po prawej W102, W109, W113 i W145; **D** – Sekwencja aminokwasowa endolizyny Ts2631 z zaznaczonymi w kwadratach resztami konserwowanymi. Czerwonymi trójkątami zaznaczone są reszty wchodzące w skład centrum aktywnego.

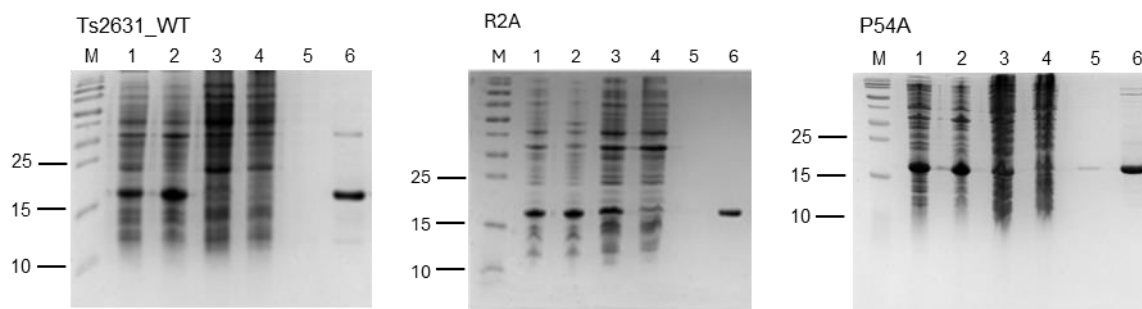
W pracy wykorzystałam jeszcze 19 wariantów substytucyjnych (reszty konserwowane na powierzchni białka oraz centrum katalitycznego), które były przygotowane podczas wcześniejszych prac charakteryzujących endolizynę Ts2631¹⁰⁷. Łącznie przetestowałam 55 wariantów substytucyjnych białka.

5.4 Nadprodukcja i oczyszczanie endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów

Endolizyna Ts2631 oraz część jej wariantów (warianty z substytucją aminokwasów konserwowanych oraz wchodzących w skład centrum katalitycznego) były już zaprojektowane podczas wcześniejszych badań i plazmidy je kodujące zostały zdeponowane w KPD. Pozostałe warianty przygotowano wykorzystując mutagenezę miejscowo-specyficzną (Metody 5.9). Uzyskanym plazmidowym DNA transformowano komórki *E. coli* DH5 α (Metody 4.10). W celu potwierdzenia otrzymania odpowiedniego konstruktu wyizolowano plazmidowe DNA, które zsekwencjonowano w firmie Genomed S.A. Wariantami zawierającymi odpowiednią mutację transformowano *E. coli* BL21(DE3)pRARE. Następnie przeprowadziłam nadprodukcję w systemie ekspresyjnym pET-15b i oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według procedury zawartej w podrozdziale Metody 4.11. Etapy oczyszczania obejmowały kolejno:

- sonikację w celu dezintegracji komórek bakteryjnych;
- wirowanie lizatu po sonikacji w celu rozdzielenia frakcji osadu od supernatantu;
- łączenie supernatantu zawierającego białka ze złożem;
- płukanie złoża z białek, które nie związały się ze złożem i związały się z nim niespecyficznie;
- elucję białka, które za pomocą znacznika His-tag związało się ze złożem;
- dializę do buforu, w którym prowadziłam daną analizę.

Początkowo podczas oczyszczania endolizyny Ts2631 supernatant, jaki otrzymywałam po wirowaniu lizatu po sonikacji, poddawałam inkubacji przez 20 minut w 75°C. Był to dodatkowy etap mający na celu pozbycie się białek termolabilnych gospodarza. Na późniejszych etapach jednak zrezygnowałam z tego kroku, ponieważ preparat, jaki otrzymywałam z pominięciem tego kroku, był równie czysty. Wariantów substytucyjnych od początku nie poddałam temu etapowi, ponieważ nie znałam ich temperatury topnienia. Skuteczność oczyszczania przeanalizowałam przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE, podczas której rozdzieliłam próby z poszczególnych etapów tego procesu. Część wyników przedstawiłam na Ryc. 13, jednak dla przejrzystości wyników wszystkie żele z oczyszczania wariantów endolizyny Ts2631 zaprezentowałam na Ryc. S4.



Ryc. 13. Trzy przykładowe wyniki przedstawiające przebieg oczyszczania endolizyny Ts2631_WT, wariantu R2A oraz wariantu P54A metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. Na rycinie ukazane są żele poliakrylamidowe po rozdzieleniu metodą SDS-PAGE (żel rozdzielający 10%) próbek zebranych z poszczególnych etapów oczyszczania. Po lewej stronie każdego żelu oznaczono masę białka (kDa) odpowiadającą wielkości prążka w białkowym wzorcu masowym. M – marker, 1 – lizat, 2 – osad, 3 – supernatant, 4 – przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 5 – płukanie kolumny, 6 – elucja.

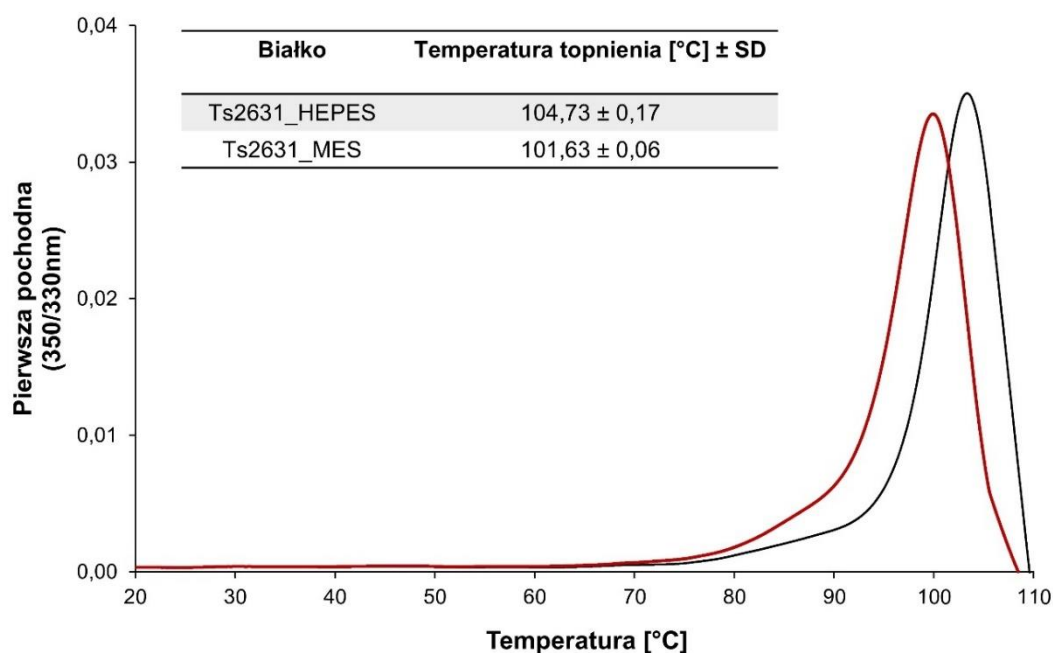
5.5 Pomiar aktywności i temperatury topnienia endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów

Do pomiaru aktywności wykorzystałam test redukcji zmętnienia (TRZ) opierający się na obserwacji zmiany gęstości optycznej (OD_{600}) po dodaniu enzymu. Substrat w reakcji stanowiły komórki *T. thermophilus* HB8 uprzednio potraktowane chloroformem w celu permeabilizacji błony komórkowej Gram-ujemnej bakterii. W ten sposób enzym może od razu przedostać się do peptydoglikanu. W badaniach nad endolizyną Ts2631 w poprzednich latach wykorzystywano stężenie $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁰⁷. Chcąc zwiększyć szansę na zaobserwowanie zmian w wariantach substytucyjnych postanowiłam zmniejszyć stężenie białka stosowanego w eksperymentach do $5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Reakcję prowadziłam przez 15 minut w 60°C . Dodatkowo białka były najpierw inkubowane przez 15 minut w 90°C i dopiero potem przeprowadziłam TRZ, by sprawdzić wpływ temperatury na aktywność danego wariantu białka. Wyniki testu przedstawiłam w wartościach [%] a aktywność endolizyny Ts2631 stanowiła 100%. Pozwoli to na obserwację stabilności kinetycznej białka. Szczegóły przeprowadzenia testu znajdują się w podrozdziale Metody 4.15.2. W celu analizy stabilności termodynamicznej endolizyny i jej wariantów określono ich T_m za pomocą nanoDSF we współpracy z dr n. med. Anną-Karoliną Kaczorowską z Katedry Mikrobiologii, Kolekcji Plazmidów i Drobnoustrojów. Technika ta pozwala określić wartość T_m poprzez monitoring zmiany fluorescencji w funkcji temperatury. W aparacie do nanoDSF można wykonać 48 pomiarów jednocześnie, co jest bardzo pomocne przy analizowaniu dużej ilości próbek.

Podczas określania stabilności termicznej endolizyny Ts2631 w poprzednich badaniach za pomocą mikrokalorymetrii VP-DSC (ang. *Variable Pressure Differential Scanning Calorimetry*) ustalono, że jego T_m wynosi $99,82^\circ\text{C}$ ¹⁰⁵. Pomiaru dokonano w buforze 20 mM

MES, pH 6,0 ze względu na techniczne ograniczenia sprzętu. Białko w tym buforze wykazuje niską aktywność, dlatego w bieżących badaniach na początku oczyszczone białko Ts2631 przedalizowałam do dwóch buforów, w których postanowiłam porównać stabilność termiczną:

- 20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl, 10% glicerol,
- 20 mM MES, pH 6,0, 25 mM NaCl, 10% glicerol.



Ryc. 14. Analiza nanoDSF endolizyny Ts2631 w dwóch buforach. Czerwona linia reprezentuje przebieg pomiaru w buforze MES (20 mM MES, pH 7,4, 25 mM NaCl i 10% glicerol) a czarna linia w buforze HEPES (20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl, 10% glicerol). W tabeli znajdują się określone wartości temperatury topnienia dla białka w obu buforach.

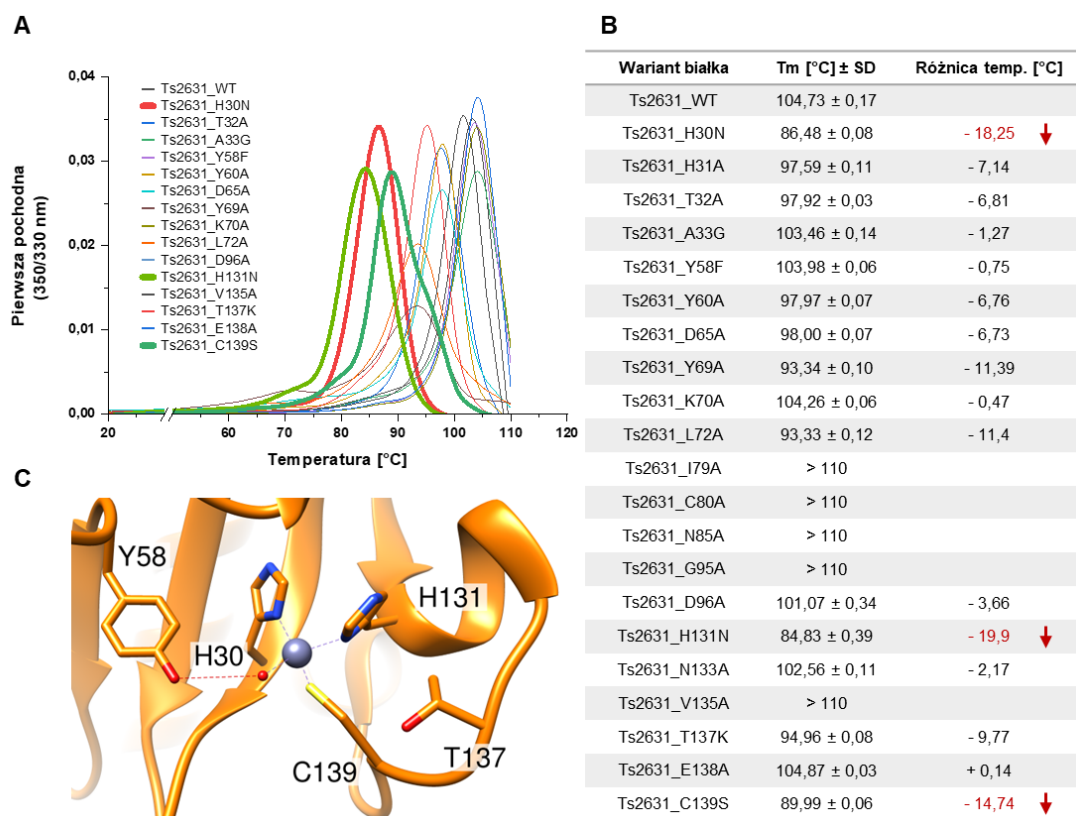
Wartość T_m jaką ustalono w buforze HEPES dla endolizyny Ts2631 to 104,73°C (Ryc. 14) i była ona o 3,1°C wyższa niż w buforze MES. W związku z tym zdecydowałam, że dalsze analizy będę prowadziła w buforze HEPES. Przypuszcza się, że różnica w temperaturach T_m pomiędzy buforami MES, która wynosi 1,81°C, może mieć dwa wyjaśnienia. Po pierwsze dodatek soli oraz 10% glicerolu przy analizie nanoDSF z pewnością wpływa pozytywnie na ustabilizowanie białka. Po drugie wykonanie pomiarów różnymi metodami może wpływać na wynik. Drugą z obserwacji poczyniono w grupie badawczej, w której porównano wartości T_m rekombinowanego kompleksu MHC-I związanego z peptydem mierzone za pomocą nanoDSF, Fluorescencji Przejściowej Denaturacji Chemicznej (ang. *Thermal Denaturation Transition*

Fluorescence – TDTF) oraz CD. Wyniki, choć podobne, różniły się między sobą od 0,3°C do 4,7°C¹⁰⁷.

W dalszej części przedstawię eksperymenty prowadzone kolejno dla wariantów reszt konserwowanych, tryptofanowych, prolinowych a na końcu argininowych.

5.5.1 Reszty konserwowane i centrum katalitycznego

Wykonane eksperymenty w przypadku reszt konserwowanych oraz z centrum katalitycznego dotyczyły tylko analizy nanoDSF (Ryc. 15A), gdyż w poprzedniej pracy wykazano ich poziom aktywności (bez inkubacji w wyższej temperaturze)¹⁰⁷. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że najniższa T_m została określona dla wariantów H30N, H131N i C139S i była ona niższa od T_m endolizyny Ts2631 kolejno o: 18,25°C, 19,90°C oraz 14,74°C (Ryc. 15B). Reszty te zaangażowane są w koordynację jonu Zn^{2+} (Ryc. 15C). Jak można zauważyć reszty katalityczne nie były zastąpione alaniną, a aminokwasami wytypowanymi na podstawie analizy porównawczej z lizozymem T7 wykonanej w trakcie poprzednich badań¹⁰⁷. Wyraźnie widać, że substytucja któregośkolwiek z aminokwasów bezpośrednio zaangażowanych w koordynację Zn^{2+} wpływa na stabilność termiczną białka, natomiast w przypadku wariantu Y58F (Ryc. 15), który koordynuje jon Zn^{2+} przez cząsteczkę wody temperatura T_m jest niższa tylko o 0,75°C w porównaniu do natywnego białka. Jony metali faktycznie są jednym z czynników, które wpływają na stabilność termiczną białek⁸⁵. Poza tym, że odgrywają istotną rolę w aktywności białka, jak np. Zn^{2+} w amidazach, czy Ca^{2+} w subtylazach.



Ryc. 15. Wynik analizy nano Różnicowej Fluorymetrii Skaningowej (nanoDSF) reszt konserwowanych na powierzchni białka Ts2631 oraz jego centrum katalitycznego. Za pomocą nanoDSF zmierzono temperaturę topnienia białka oraz jego wariantów. Pomiaru dokonano w zakresie temperatur od 20°C do 110°C (maksymalna temperatura urządzenia). Na wykresie oraz w danych z tabeli znajdują się średnie wyniki z czterech pomiarów. **A** – wykresy prezentujące przebieg reakcji i wskazujące moment, w którym połowa białka znajdowała się w formie rozfałdowanej. Każdy kolor linii odpowiada poszczególnemu wariantowi białka. Pogubieniem wyszczególniono najniższe wartości T_m. **B** – tabela przedstawiająca wartości T_m poszczególnych wariantów endolizyny Ts2631. **C** – Widok na centrum katalityczne endolizyny Ts2631, wewnątrz którego znajduje się Zn²⁺ (na szaro) koordynowany bezpośrednio przez H30, H131 i C139 oraz przez Y58 poprzez cząsteczkę wody (na czerwono).

Niektóre termofilne enzymy posiadają nawet więcej miejsc wiązania jonów, których brak u mezofilnych odpowiedników. Termofilna proteaza serynowa AkP z *Bacillus* sp. Ak.1 z super-rodziny subtylaz wiąże trzy jony Ca²⁺, podczas gdy jej mezofilne homologi wiążą tylko dwa jony Ca²⁺. Sprawdzono, że okres półtrwania białka AkP w 80°C bez obecności jonów Ca²⁺ wynosi poniżej jednej minuty, a przy ich obecności 15 godzin¹⁵⁸. Jony metali mogą tworzyć także dodatkowe wiązania, które zwiększą stabilność struktury. W jednym z badań zaprojektowano metalo-minibiałko, które utworzono z domeny WW hPin1, która składa się z trzech β-nici połączonych krótkimi pętlami. Stworzono kilka wariantów domeny w taki sposób, aby mogła wiązać metale dwuwartościowe, jak Ni²⁺, Zn²⁺ i Cu²⁺. Wariant pierwotny posiadał tylko miejsce wiązania jonów bez dodatkowych modyfikacji. Wykazał najwyższą T_m

po wiązaniu z jonem Zn^{2+} , która wyniosła $34^{\circ}C$, natomiast jego struktura nie była stabilna i ulegała rozfałdowaniu. W pozostałych wariantach dokonywano różnych zmian w obrębie pętli, ale we wszystkich zamieniono metioninę znajdującą się na końcu pierwszej β -nici na niekanoniczny aminokwas norleucynę. Jeden z wariantów wykazał wysoką T_m . Po wiązaniu Zn^{2+} wyniosła ona $70^{\circ}C$ ¹⁰⁰.

Z kolei wartość T_m wariantu T137K (T137 wchodzi w skład centrum katalitycznego), jest niższa od endolizyny typu dzikiego o $9,77^{\circ}C$ (Ryc. 15B). Obniżenie wartości T_m może być wynikiem kilku zdarzeń. Wymieniony wariant znajduje się bardzo blisko reszty C139 (Ryc. 15C), która zaangażowana jest w koordynację Zn^{2+} . Może więc dochodzić do zaburzenia lokalnej struktury i sieci wiązań wodorowych, np. osłabiając wiązanie z jonem Zn^{2+} . Lizyna (K), którą została zastąpiona treonina (T) w miejscu 137 ma ładunek dodatni, co może prowadzić do powstania niekorzystnych oddziaływań elektrostatycznych z tym jonem a dodatnio naładowany koniec lizyny i jonu odpychając się mogą zaburzyć lokalną geometrię wiązań^{159,160}.

Warianty Y69A oraz L72A także mają obniżoną wartość T_m w stosunku do białka typu dzikiego o około $11,4^{\circ}C$ (Ryc. 15B). Tyr (Y) jest aminokwasem aromatycznym i może być donorem wiązań wodorowych. Nie można wykluczyć, że aminokwas ten bierze udział w oddziaływaniu $\pi - \pi$ z Y63 znajdujące się po przekątnej na pętli. Y69 znajduje się na zewnętrznej β -nici, a reszty tyrozynowe odgrywają istotną rolę w stabilizacji upakowania w β -harmonijkach^{161,162}. Na dodatek tyrozyna posiada polarny łańcuch boczny, w którym znajduje się grupa hydroksylowa nadając jej hydrofilowy charakter przez co oddziałuje z wodą. Znajdując się w części ekspozycyjnej, po zamianie na mały aminokwas, jakim jest alanina, może powstawać lokalna przestrzeń¹⁶³. Brak tyrozyny w tym miejscu mógł zaburzyć potrzebne oddziaływania i w konsekwencji doprowadzić do obniżenia stabilności termicznej białka. Z kolei L72 znajduje się na pętli. Jest to aminokwas hydrofobowy, który odpowiada za integralność białka i stabilność hydrofobowego rdzenia. Zmiana na mniejszy aminokwas mogła doprowadzić do zwiększenia dynamiki konformacyjnej pętli oraz utraty oddziaływań van der Waalsa^{164,165}.

W przypadku aż pięciu wariantów: I79A, C80A, N85A, G95A i V135A wartość T_m przekroczyła $110^{\circ}C$ (Ryc. 15B) i nie była możliwa do określenia ze względu na ograniczenia urządzenia pomiarowego. Szczególnym zaskoczeniem była informacja, że zmiana cysteiny na alaninę wywołała wzrost wartości T_m , ponieważ jest to aminokwas, który tworzy wiązania disulfidowe uważane za istotny czynnik stabilności termicznej białek. Takie wiązanie

prawdopodobnie występuje pomiędzy resztami C80 – C90. Okazuje się jednak, że w pewnych sytuacjach takie wiązanie wymusza powstanie lokalnego napięcia w strukturze białka i po usunięciu sztywnego mostka może dojść do odziaływań, które ustabilizują białko termicznie. Wiadomo jednak z poprzednich badań, że pierwotna konformacja białka ma znaczenie w kontekście aktywności litycznej endolizyny Ts2631¹⁰⁷ i obecność tego mostka może wskazywać na kompromis pomiędzy stabilnością termiczną, a jego prawidłową aktywnością lityczną.

Pozostałe reszty, w których wariantach zaobserwowano $T_m > 110^\circ\text{C}$, także mogą prowadzić do lokalnych napięć. W przypadku I79A mogło dojść do przemodelowania sąsiednich łańcuchów bocznych¹⁶⁶ i do powstania bardziej korzystnego układu, który wpłynął na stabilność termiczną białka¹⁶⁷. Jest to reszta, która występuje zaraz obok C80. Według wcześniejszych doświadczeń aktywność lityczna białka w stosunku do wariantu dzikiego utrzymuje się na poziomie 60%¹⁰⁷. Zmiana może być powiązana z prawidłowym tworzeniem się wiązań disulfidowych, albo po prostu ze zmianą ruchliwości fragmentu, na którym się znajduje tworząc silniejsze połączenia i zmianę struktury III-rzędowej¹⁶⁸. Może to skutkować konformacją, która ma pozytywny wpływ na stabilność termiczną białka, jednak uniemożliwia przyjęcie poprawnej konformacji w formie aktywnej.

Reszta N85 zlokalizowana jest na trzeciej α -helisie w białku. Wcześniejsze badania wykazały, że wariant endolizyny Ts2631 N85A jest nieaktywny litycznie i nie jest to spowodowane brakiem oddziaływania endolizyny z peptydoglikanem. Analiza struktury II-rzędowej nie wykazała istotnych różnic w porównaniu do białka typu dzikiego¹⁰⁷. N85 jest aminokwasem znajdującym się wewnątrz helisy, a nie zupełnie na jej końcu przez co mogły tworzyć się niekorzystne wiązania wodorowe dla stabilności układu, prowadząc do napięć. Zmiana na alaninę mogła ustabilizować lokalne uwarstwienie α -helisy. Jest to znane zjawisko, w którym alanina jako aminokwas o małym łańcuchu bocznym i wysokiej zdolności do stabilizowania struktury helikalnej prowadzi do zmniejszenia lokalnych fluktuacji i zwiększenia jej odporności na denaturację¹⁶⁹.

Kolejnym wariantem o T_m wyższej niż 110°C jest G95A. Glicyna w pozycji 95 znajduje się na pętli. Wariant G95A jest aktywny w 90% w stosunku do natywnego białka¹⁰⁷. Glicyna jest najmniejszym aminokwasem i często prowadzi do lokalnej mobilności potencjalnie zwiększając entropię białka, co może obniżyć jego stabilność. Zamiana na alaninę mogła nieco ograniczyć ruchomość pętli oraz poprawić jej pakowanie co przeniosło się na wyższą stabilność termiczną¹⁷⁰.

Ostatnim z omawianych wariantów jest V135A, gdzie zastąpiony aminokwas znajduje się na końcu piątej α -helisy, niedaleko od centrum katalitycznego. Ten wariant wykazuje niższą aktywność lityczną, niż białko natywne a wynosi ona około 60%¹⁰⁷. Rozgałęzione aa, takie jak walina i izoleucyna występując na końcu α -helisy (zwłaszcza w pozycji C-cap) mogą doprowadzać do naprężeń sterycznych i destabilizacji końca helisy. Z kolei alanina występując na końcu α -helisy dzięki małemu i niepolarnemu łańcuchowi bocznemu może redukować niekorzystne napięcia konformacyjne¹⁷¹. Co prawda walina występując tak blisko centrum katalitycznego może mieć znaczenie dla poprawnego działania centrum. Jej zamiana na alaninę mogła doprowadzić do potrzeby wykorzystania większej energii potrzebnej do rozerwania wiązań podczas zmiany konformacji białka, a nadmierna stabilizacja regionów blisko centrum katalitycznego mogła ograniczyć ruchy dynamiczne, co przełożyło się na zmniejszenie aktywności enzymatycznej^{172,173}.

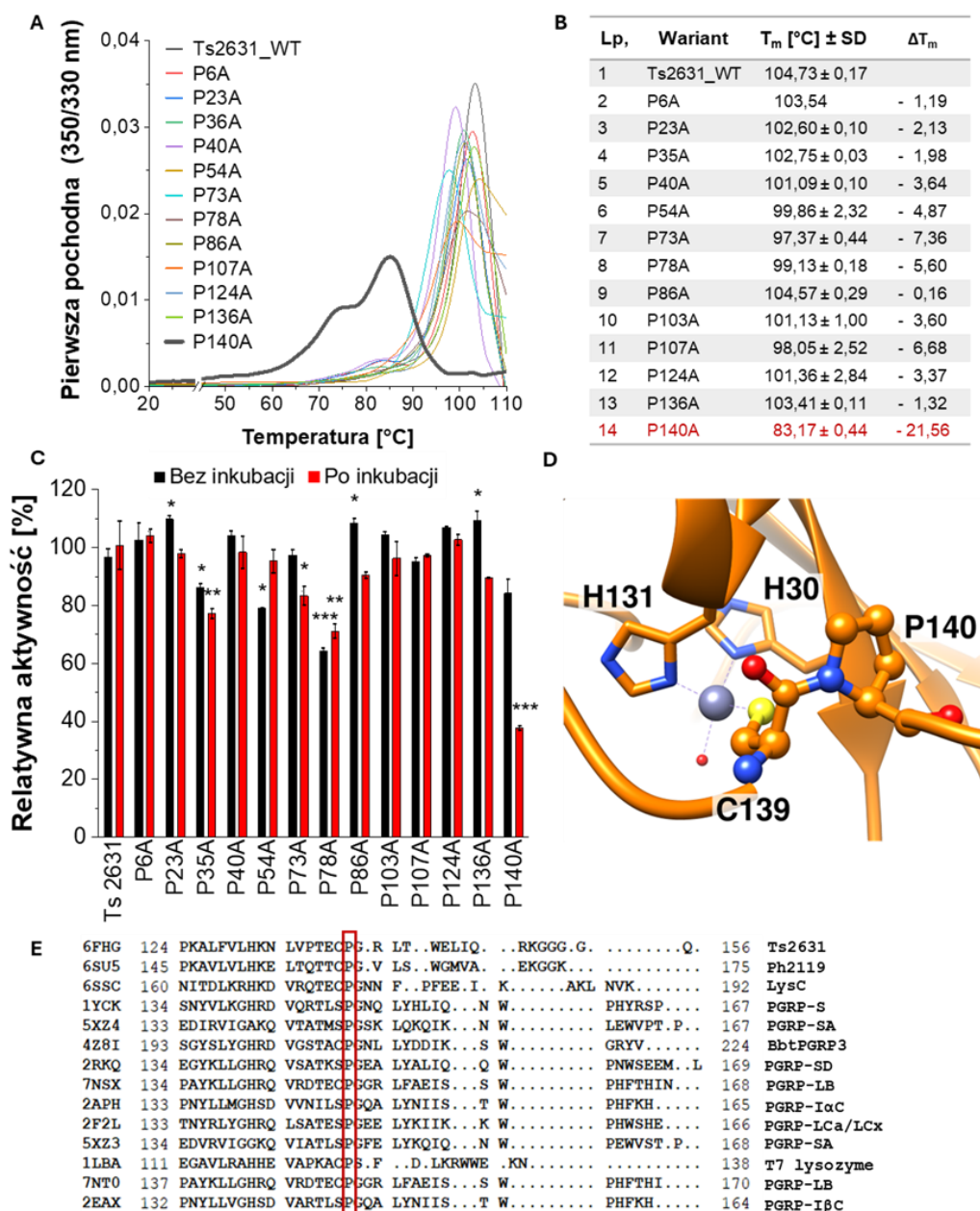
Mechanizmy te nie zostały zweryfikowane eksperymentalnie, ale można tego dokonać poprzez wykonanie dodatkowych mutacji kontrolnych, porównania działania w warunkach denaturujących (np. z DTT) i niedenaturujących oraz wykonanie analiz badających dynamikę, czy struktur krystalicznych wariantów substytucyjnych oraz sprawdzenie entalpii. W tej pracy skupiłam się jedynie na aspekcie, w którym stabilność termodynamiczna została obniżona.

5.5.2 Warianty prolinowe

W przypadku wariantów prolinowych, których było trzynaście, zaobserwowałam zdecydowany spadek aktywności po inkubacji białka w 90°C tylko w przypadku wariantu P140A. Aktywność tego wariantu wyniosła 37,62% (Ryc. 16C) a T_m została obniżona o 21,56°C (Ryc. 16A, 16B). Wariant P78A z kolei wykazał zredukowaną aktywność lityczną w 60°C do poziomu 64,34% (Ryc. 16C) podczas gdy wartość T_m wyniosła 99,13°C, czyli była niższa o zaledwie 5,6°C od T_m endolizyny Ts2631 (Ryc. 16B). Jednak po inkubacji poziom aktywności nieco się poprawił i wynosił 71,16% w odniesieniu do aktywności białka typu dzikiego (Ryc. 16C).

Reszty P78 i P140 znajdują się na pętlach, więc początkowo założyłam, że powinny je tylko stabilizować obniżając czynnik B w pętli. Jednak w przypadku innych reszt proliny, które zostały zastąpione alaniną nie zaobserwowałam wyraźnego spadku aktywności. P140 znajduje się niedaleko centrum aktywnego, zaraz za C139, która jest jednym z aminokwasów koordynujących jon Zn^{2+} . Prolina jest związana z cysteiną w pozycji *cis*, co może pozwalać na odpowiednie położenie cysteiny do interakcji z Zn^{2+} (Ryc. 16D). Prolina w tej pozycji jest także

silnie konserwowanym aminokwasem wśród innych amidaz i PGRP (Ryc. 16E). W przypadku wariantu P140A połączenie między alaniną a cysteiną może występować w pozycji *trans*, co może zaburzyć interakcję cysteiny z Zn^{2+} . To z kolei poskutkowało utratą stabilności termicznej białka, a jak już wiemy z wcześniejszych doświadczeń (podrozdział 5.5.1.) jon metalu jest istotny w stabilności termicznej białka.



Ryc. 16. Analiza stabilności termicznej oraz aktywności wariantów prolinowych endolizyny Ts2631. A – wykres reprezentujący wyniki z pomiarów nanoDSF. Białka analizowano w temperaturze od 20°C do 110°C. Każdy kolor reprezentuje inny wariant białka. Każdy eksperyment został powtórzony 4-krotnie. Pogrubiona linia na wykresie wskazuje na wariant o najniższej temperaturze topnienia (T_m). **B** – wyniki pomiarów T_m otrzymanych za pomocą nanoDSF; najwyższy spadek ΔT_m zaznaczono kolorem czerwonym. **C** – test redukcji zmętnienia (TRZ)

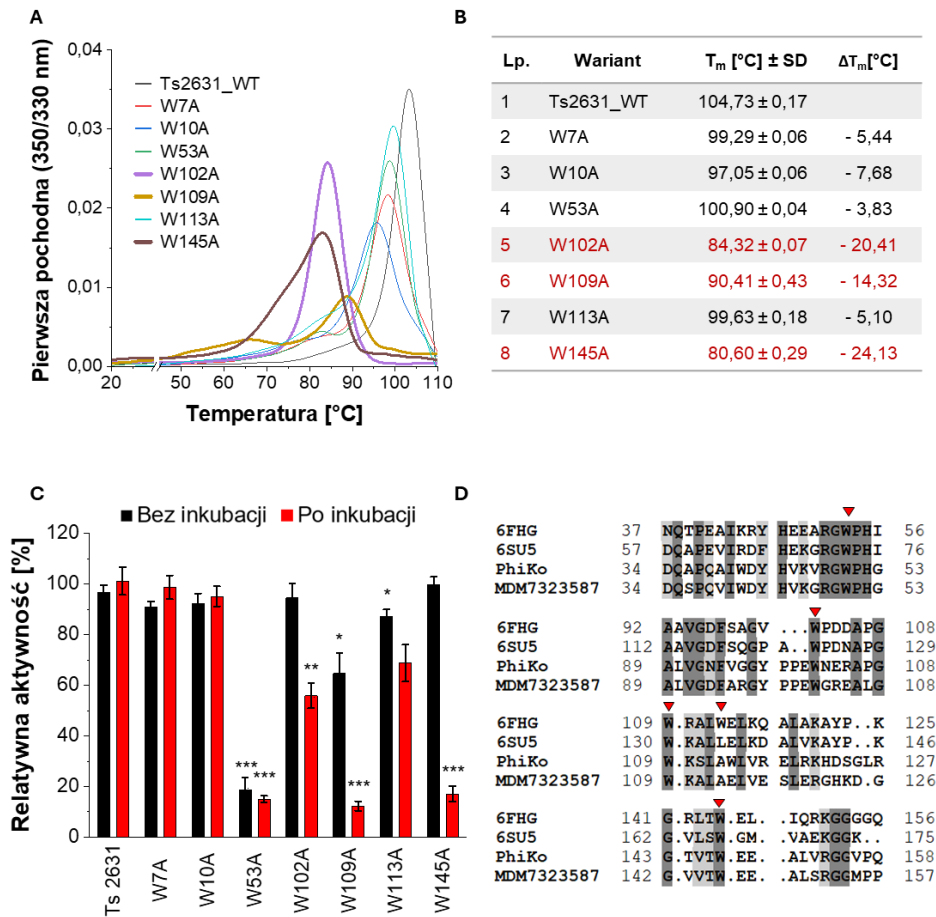
przeprowadzony w 60°C przez 15 minut, przy stężeniu białka 5 µg/mL. Białka inkubowano w 90°C przez 15 minut (czerwone słupki), bądź nie (czarne słupki) i dodawano do substratu, jakim były komórki bakteryjne *Thermus thermophilus* HB8 DSM 579 z permeabilizowaną błoną. Aktywność została wyrażona jako procent [%] relatywnej aktywności porównanej do endolizyny Ts2631, która nie była poddana inkubacji w 90°C. Eksperyment został powtórzony trzykrotnie, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta. **D** – fragment rdzenia endolizyny Ts2631 z przybliżeniem na wiązanie między C139 a P140 w pozycji *cis*. **E** – porównanie sekwencji endolizyny Ts2631 z nałożonymi 13 najbliższymi homologami strukturalnymi z bazy PDB, które znaleziono za pomocą Foldseek. 6FHG – endolizyna Ts2631; 6SU5 – endolizyna Ph2119; 6SSC – LysC; 1YCK – ludzkie PGRP-S; 5XZ4 - PGRP-SA trzmiela; 4Z8I - *Branchiostoma belcheri tsingtauense* BbtPGRP3; 2RKQ – *Drosophila melanogaster* PGRP-SD; 7NSX – *D. melanogaster* PGRP-LB; 2APH – ludzkie PGRP-IaC; 2F2L – *D. melanogaster* kompleks ektodomeny PGRP-LCa i PGRP-LCx; 5XZ3 – *Apis mellifera* PGRP-SA; 1LBA – lizozym T7; 7NT0 – *D. melanogaster* PGRP-LB; 2EAX – ludzkie PGRP-IβC. Pozycja konserwowanej proliny jest zaznaczona czerwonym prostokątem.

Wariant P78A znajduje się na pętli, gdzie po jednej jego stronie znajduje się V77 a po drugiej I79, dwa rozgałęzione aa, które wszystkie razem tworzą sztywną pętlę. Zmiana proliny na alaninę mogła doprowadzić do zwiększenia dynamiki konformacyjnej tego regionu na tyle, że skutkowało to obniżeniem aktywności. Podczas badań nad konserwowaną pętlą WPD w fosfatazach tyrozynowych wykonano skan alaninowy, gdzie wykazano, że między innymi wariant V424A oraz P428A prawdopodobnie doprowadziły do zwiększenia dynamiki konformacyjnej pętli, co akurat w tamtym przypadku doprowadziło do poprawy aktywności białka¹⁷⁴. W przypadku wariantów P23A, P86A i P136A zaobserwowałam nieduży, ale istotny statystycznie wzrost aktywności w porównaniu do endolizyny Ts2631 (Ryc. 16C), co mogło być spowodowane wzrostem dynamiki konformacyjnej tego regionu i zajęciem korzystniejszych dla aktywności litycznej białka oddziaływań. Natomiast po wstępnej inkubacji tych wariantów w 90°C aktywność wraca do poziomu endolizyny Ts2631 (Ryc. 16C).

5.5.3 Warianty tryptofanowe

W wyniku analizy nanoDSF okazało się, że T_m 3 z 7 wariantów tryptofanowych: W102A, W109A i W145A jest zdecydowanie obniżona w porównaniu do endolizyny Ts2631 (Ryc. 17A) kolejno o: 20,41°C, 14,32°C i 24,13°C (Ryc. 17B). W TRZ z kolei wykazałam, że te same warianty mają zredukowaną aktywność lityczną po inkubacji w 90°C kolejno do poziomu 55,86%, 12,30% i 17,02% (Ryc. 17C). Wariant W113A odznaczał się spadkiem aktywności do poziomu 68,74% po inkubacji w 90°C, ale T_m była obniżona jedynie o 5,1°C w porównaniu do endolizyny Ts2631 (Ryc. 17B). Może to wskazywać na istotną rolę reszt W102, W109 i W145, tym bardziej, że po porównaniu sekwencji endolizyny Ts2631 z innymi podobnymi termofilnymi białkami reszty te znajdują się w tym samym miejscu,

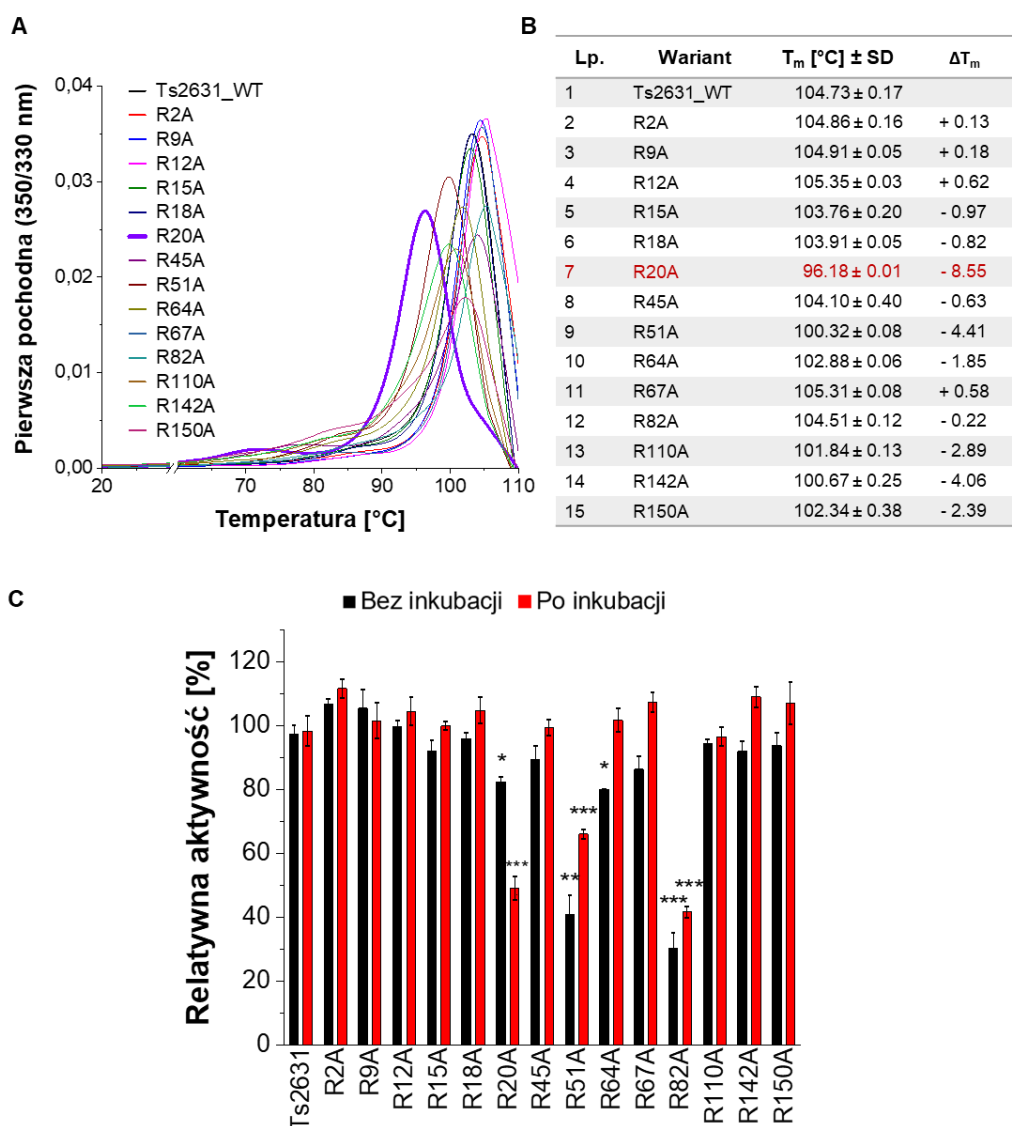
w przeciwieństwie do W113, gdzie w tej samej pozycji u pozostałych białek znajdują się leucyna lub alanina (Ryc. 17D). Tryptofany są jednymi z aminokwasów uważanych za istotne w stabilności termicznej ze względu na mnogość interakcji, jakie mogą jednocześnie zachodzić z ich udziałem.



Ryc. 17. Analiza aktywności litycznej i temperatury topnienia wariantów tryptofanowych endolizyny Ts2631. **A** – wykres reprezentujący wyniki z pomiarów nanoDSF. Każdy eksperyment został powtórzony 4-krotnie. **B** – wyniki pomiarów T_m otrzymanych za pomocą nanoDSF. **C** – Test redukcji zmętnienia; czarne słupki wskazują na eksperyment prowadzony w 60°C przez 15 minut, przy stężeniu białka 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Czerwone słupki wskazują na eksperyment, gdzie białka były inkubowane w 90°C przez 15 minut przed dodaniem do substratu, jakim były komórki bakteryjne *Thermus thermophilus* HB8 DSM 579 traktowane chloroformem. Aktywność endolizyny Ts2631, która nie była poddana inkubacji w 90°C wskazuje na 100% aktywności białka. Eksperyment został powtórzony trzykrotnie, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta. **D** – Fragmenty porównania sekwencji endolizyny Ts2631 z innymi termofilnymi białkami. Czerwonymi trójkątami wskazano na pozycję W53, W102, W109, W113 i W145.

5.5.4 Warianty argininowe

Analizując 14 wariantów argininowych, nie stwierdziłam tak spektakularnych różnic w spadku T_m (Ryc. 18A, 18B) oraz aktywności białka (Ryc. 18C), jak w przypadku pozostałych reszt. Jedynie wariant R20A wykazał niższą od endolizyny Ts2631 T_m o 8,55°C (Ryc. 18B), a po inkubacji w 90°C wykazał spadek aktywności do 49,13%, wykazując się aktywnością na poziomie 82,4% w temperaturze 60°C (Ryc. 18C).

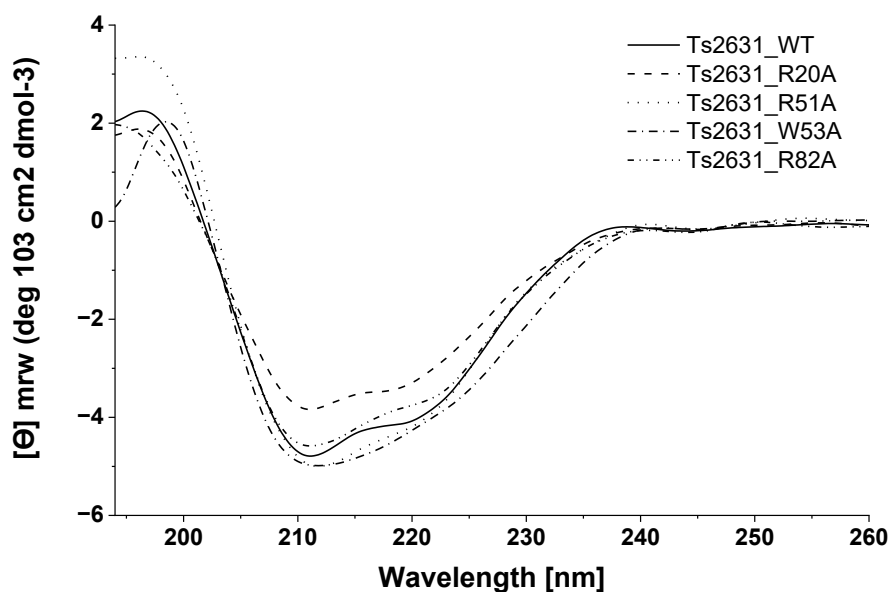


Ryc. 18. Analiza aktywności litycznej i temperatury topnienia wariantów argininowych endolizyny Ts2631. A – wyniki z pomiarów nano Różnicowej Fluorymetrii Skaningowej (nanoDSF). Każdy wariant był mierzony w 4 powtórzeniach, w zakresie temperatur od 20°C do 110°C. B – wyniki pomiarów Temperatury topnienia (T_m) otrzymanych za pomocą nanoDSF, ΔT_m wskazuje na różnicę T_m między wariantem a Ts2631_WT. C – test aktywności prowadzono w 60°C przez 15 minut (stężeniu białka 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Warianty były inkubowane w 90°C przez 15 minut (czerwone słupki), bądź nie (czarne słupki). Aktywność została wyrażona jako procent [%]

relatywnej aktywności porównanej do białka typu dzikiego (Ts2631_WT), która nie była poddana inkubacji w 90°C. Eksperyment został powtórzony trzy razy, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta.

Warianty R51A i R82A wykazały istotnie obniżoną aktywność w 60°C bez wcześniejszego grzania w 90°C i wyniosła ona kolejno 41,02% oraz 30,21% (Ryc. 18C). Ich T_m była obniżona o zaledwie 4,41°C (R51A) i 0,22°C (R82A) (Ryc. 18B). Podobnie było w przypadku wariantu W53A, który wykazywał wyraźnie zredukowaną aktywność do 18,7% już w 60°C. Z kolei wartość T_m W53A jest niższa o 3,83°C od endolizyny Ts2631 (Ryc. 17A, 17B). Tryptofan jest dużym aminokwasem i podstawienie tej reszty na tak małą jak alanina, mogła doprowadzić do zmiany w konformacji białka, a w konsekwencji zaburzyć jego aktywność. W związku z tymi obserwacjami warianty: R20A, R51A, W53A i R82A poddałam dalszej analizie. Przeanalizowałam strukturę II-rzędową białka za pomocą pomiaru spektrum dichroizmu kołowego (CD). Jest to optyczna metoda spektroskopowa, w której wykorzystuje się zróżnicowaną absorpcję światła ultrafioletowego (UV) spolaryzowanego lewo- i prawoskrętnie. Można ją wykorzystać by zdobyć informację o strukturalnej konformacji białek¹⁷⁵. Nie stwierdziłam jednak istotnych zmian w strukturze żadnego z badanych wariantów (Ryc. 19).

W53 znajduje się w niedalekiej odległości od R51, a także R82 dlatego możliwe, że zachodzi oddziaływanie kation- π pomiędzy tymi aminokwasami. Niedaleko też znajduje się H47, z którą W53 potencjalnie mógłby wchodzić w interakcje $\pi - \pi$, które choć słabsze, to nadal mogą stabilizować białko. Tryptofany mogą działać jako centralne połączenia w białku i utrata tego strategicznego punktu może destabilizować strukturę białka^{176,177}.



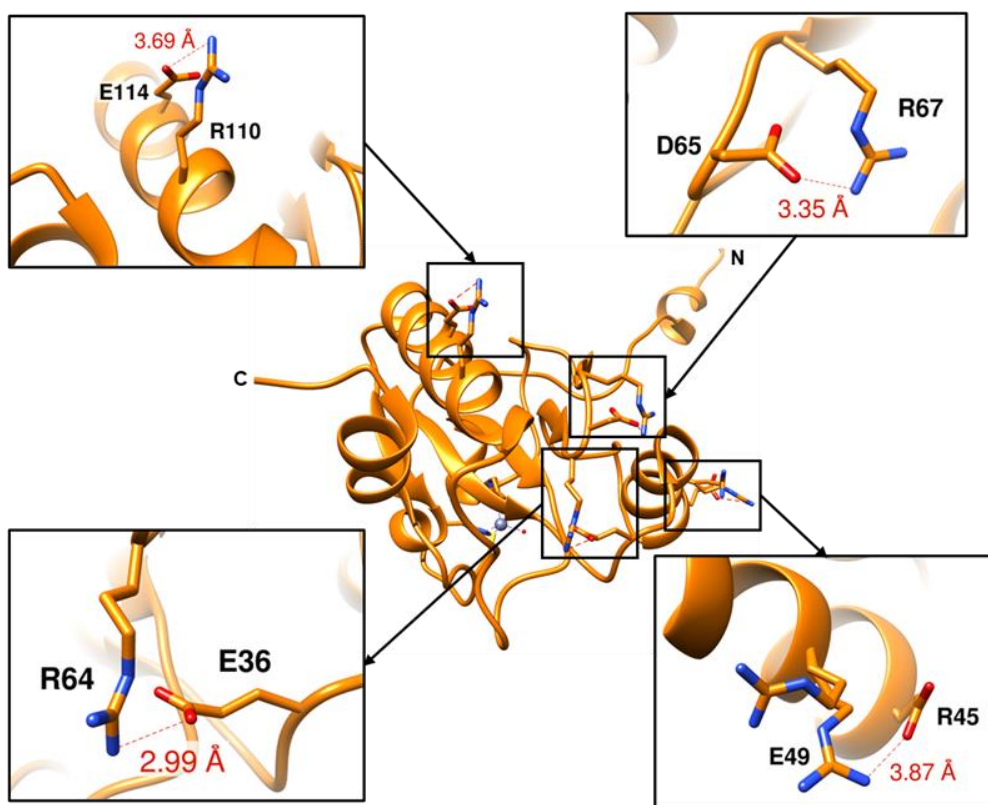
Ryc. 19. Wynik spektroskopii dichroizmu kołowego endolizyny Ts2631 i jej wariantów substytucyjnych: R20A, R51A, W53A i R82A. Białka zostały przygotowane w stężeniu 7,41 μM (0,15 mg/mL) i zawieszono je w 10 mM potasowo-fosforanowym buforze o pH 8,0 z dodatkiem 150 mM siarczanu amonu i 10% glicerolem. Pomiaru widm absorbancji dokonano w temperaturze pokojowej. Widma pokrywają się ze sobą, co może świadczyć o braku wpływu danej mutacji na strukturę II-rzędową białka.

Z kolei argininy to aa, które mogą brać udział w kilku interakcjach. Są to dodatnio naładowane reszty, które mogą tworzyć oddziaływania kation- π . Biorąc pod uwagę, że znajdują się w niedalekiej odległości od W53 mogły wchodzić z nim w interakcje. Jednak dodatnio naładowane aminokwasy, jak arginina i lizyna mogą też oddziaływać z ujemnie naładowanymi resztami kwasu glutaminowego, bądź kwasu asparaginowego tworząc tzw. mostki solne. Aby takie oddziaływanie mogło zajść odległość nie może przekraczać 4 Å, co jest charakterystyczne dla oddziaływań elektrostatycznych¹⁷⁸. Niektóre badania pokazują, że w białkach termofilnych takich oddziaływań jest więcej niż w mezofilnych¹⁷⁹. Mostki solne także mogą wpłynąć na stabilność termiczną białka i są badania, które pokazują, że tworząc nowe mostki solne można podnieść jego stabilność termiczną. Prowadzono badania nad Paliferminem, 7 Czynnikiem Wzrostu Fibroblastów (*ang. Fibroblast Growth factor 7, FGF7*) w formie skróconej na N-końcu, który jest lekiem stosowanym w leczeniu zapalenia błony śluzowej jamy ustnej oraz jest składnikiem kosmetyków przeciwstarzeniowych. Niestety jest on niestabilny w temperaturze pokojowej i jego użytkowanie jest trudne, dlatego starano się podnieść stabilność termiczną tego czynnika. Najpierw stworzono wariant A120C, który podniósł T_m o zaledwie 0,67°C, ale i tak ustabilizował białko. Następnie zdecydowano się utworzyć wariant, w którym powstały mostki solne pomiędzy arginina a dwiema resztami kwasu glutaminowego. W związku z tym

stworzono wariant A120C_K126E_K178E, w którym udało się podnieść T_m aż o $15,24^{\circ}\text{C}^{180}$. W przypadku endolizyny Ts2631 nie stwierdziłam jednak, aby reszty R51, czy R82 uczestniczyły w podobnych oddziaływaniach. Natomiast zaobserwowałam, że w przypadku endolizyny Ts2631 możliwe jest tworzenie się mostków solnych pomiędzy resztami występującymi na powierzchni białka (Ryc. 20) i mogą być to pary:

- K44 – E48
- R45 – E49
- E36 – R64
- D65 – R67
- R110 – E114
- D104 – K151

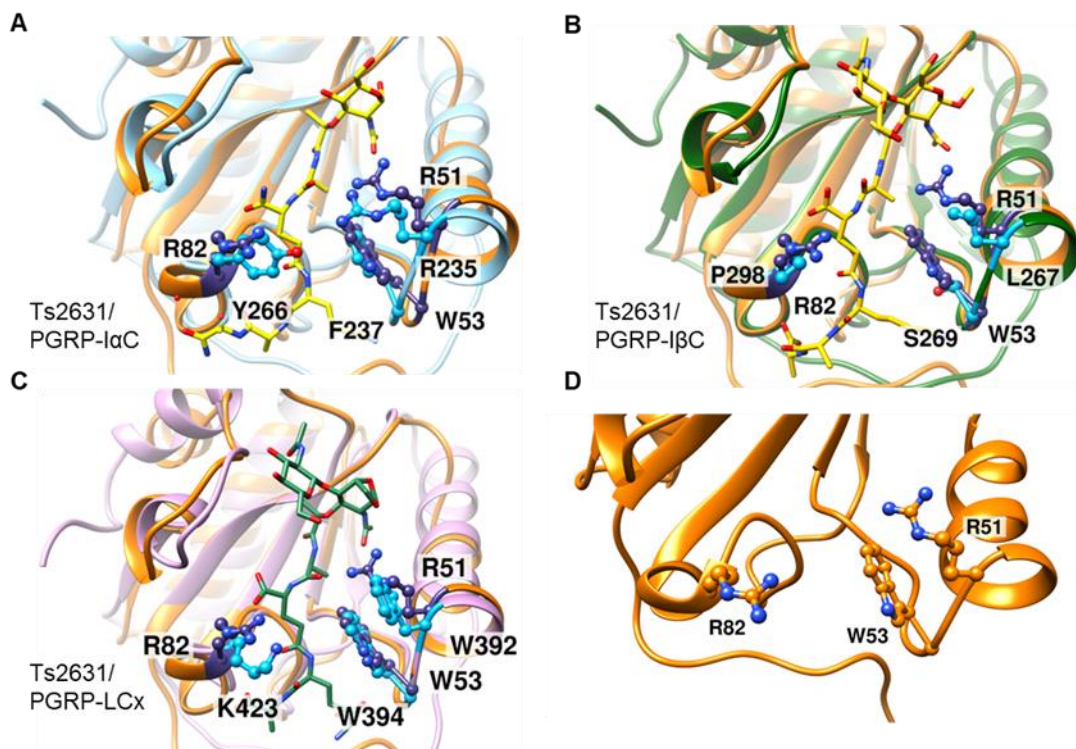
Nie wykazałam jednak, aby któryś z mostków, który mógłby być tworzony przez argininy zaburzył stabilność termiczną białka, gdyż T_m tych wariantów była zbliżona do T_m endolizyny Ts2631. Żaden z mostków nie tworzy sieci mostków solnych, a pojedyncze mostki stabilizujące helisy, bądź dwie przeciwległe pętle nie wykazują widocznego efektu na stabilność termiczną.



Ryc. 20. Przykłady możliwych mostków solnych, jakie występują w endolizynie Ts2631. Zbliżenie na mostki solne, które tworzone są przez argininę. Odległość pomiędzy łańcuchami bocznymi naładowanych reszt wyrażona jest w Ångstrmach.

5.6 Test wiązania peptydoglikanu

Endolizyny to białka, które wiążą się w określony sposób z peptydoglikanem. Endolizyna Ts2631 zawiera domenę PGRP, w której znajduje się rowek wiążący peptydoglikan (w nim znajduje się miejsce wiązania Zn^{2+}). Zdecydowałam się sprawdzić, czy reszty R51, W53 oraz R82 mogą być zaangażowane w wiązanie peptydoglikanu. Dlatego przyjrzałam się bliżej mechanizmowi wiązania innych PGRP, które są bliskimi homologami strukturalnymi endolizyny Ts2631. Z bazy PDB wybrałam takie białka, których oddziaływanie było zbadane z fragmentami peptydoglikanu Gram-ujemnej i Gram-dodatniej bakterii.

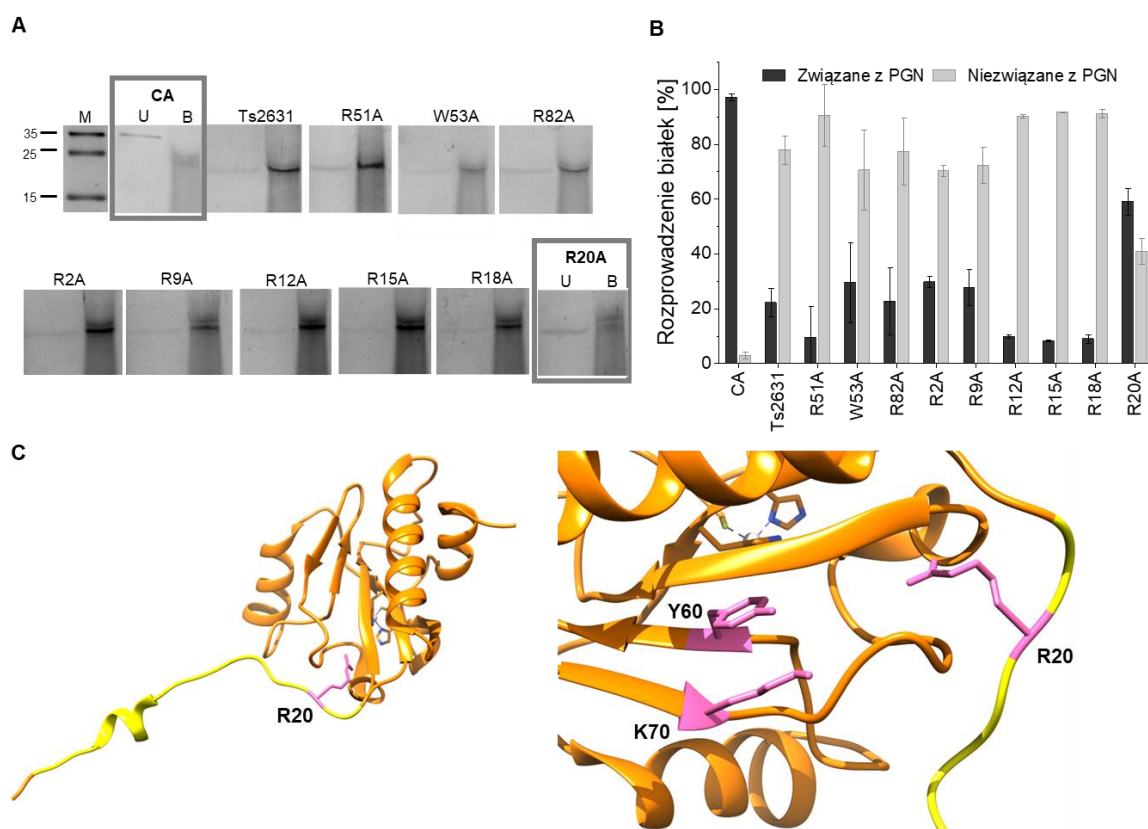


Ryc. 21. Nalożone na siebie struktury przestrzenne endolizyny Ts2631 i trzech homologicznych PGRP. Wskazane są pozycje R51, W53 i R82 endolizyny i odpowiadające im reszty białek homologicznych strukturą: **A** – ludzkie PGRP-I α C (na niebiesko, PDB: 2APH), **B** – ludzkie PGRP-I β C (na ciemno zielono, PDB: 2EAX), **C** – ektodomena *Drosophila melanogaster* PGRP-LCx (na różowo, PDB: 2F2L). **D** – endolizyna Ts2631 (PDB: 6FHG). Endolizyna Ts2631 ma łańcuch pokolorowany na pomarańczowo. Peptydoglikan o typie Lys jest zaznaczony żółtym kolorem, natomiast o typie DAP kolorem zielonym.

Nałożyłam na siebie struktury endolizyny Ts2631 i trzech innych PGRP (Ryc. 21). Dwa z wybranych enzymów: ludzkie PGRP-I α C (Ryc. 21A) oraz ludzka C-końca domena wiążąca PGN PGRP-I β C (Ryc. 21B) rozpoznawały PGN o typie Lys, oddziałując z peptydem macierzystym L-Ala-L-Ala-D-*iso*-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala¹⁸¹. Trzecie białko to PGRP-LCx pochodzące z *D. melanogaster*, które rozpoznaje PGN o typie DAP (Ryc. 21C) o budowie peptydu macierzystego L-Ala-D-*iso*-Glu-m-DAP-D-Ala-D-Ala¹⁸².

Przyglądając się nałożonym strukturom białek zaobserwowałam, że reszty endolizyny Ts2631 nakładają się z resztami trzech PGRP, które odpowiadają za interakcję z PGNem. R51 nakłada się z R235 PGRP-I α C, L267 PGRP-I β C i W392 PGRP-LCx. Reszta W53 odpowiada w swojej pozycji resztom F237, S269 oraz W394 kolejno tym samym białkom, a R82 nakłada się z Y266, P298 i K423 w PGRP według tej samej kolejności (Ryc. 21).

Postanowiłam wykonać test, który pokazałby, czy reszty R51, W53, albo R82 są zaangażowane w wiązanie PGNu. Dodatkowo skupiłam się na sześciu resztach argininy, które znajdują się na N-końcowym wydłużeniu endolizyny Ts22631. We wcześniejszych badaniach wykazano, że delecja regionu 2-22 zaburza oddziaływanie białka z substratem¹⁰⁷. Argininy, to dodatnio naładowane aa, więc można przypuszczać, że mogą one oddziaływać z ujemnie naładowanym PGN.



Ryc. 22. Testy wiązania peptydoglikanu. **A** – Wynik testu wiązania po przeprowadzonym rozdziale białek SDS-PAGE w żelu trycynowym. Warianty endolizyny Ts2631 dodano do peptydoglikanu wyizolowanego z *T. thermophilus* HB8, inkubowane i rozdzielone na dwie frakcje. U – wskazuje na frakcję supernatantu, czyli białka niezwiązanego z peptydoglikanem (PGN) natomiast B – to frakcja osadu, gdzie znajduje się białko związane z substratem. CA – anhidraza węglowa (kontrola negatywna). Prostokątami zaznaczono białka, które w większości znajdowały się we frakcji nie związanej z PGN. M – marker PageRuler prestained proein lader. **B** – densytometria przeprowadzona w programie ImageJ wskazująca na gęstość prążka wskazującego na obecność białka w części związanej z PGN, osadem (czarny słupek), bądź w części niezwiązanej z PGN, supernatantem (szary słupek); wynik przedstawiono w postaci procentowej. Średnia została wyznaczona z dwóch lub trzech

powtórzeń (słupki błędów wskazują odchylenie standardowe). C – Po lewej stronie struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 z zaznaczonym kolorem żółtym 20-aminokwasowym regionem i resztą R20. Po prawej zbliżenie na resztę R20 oraz K70 i Y60 (oznaczone kolorem różowym), o których wiadomo, że wchodzi w interakcję w PGN.

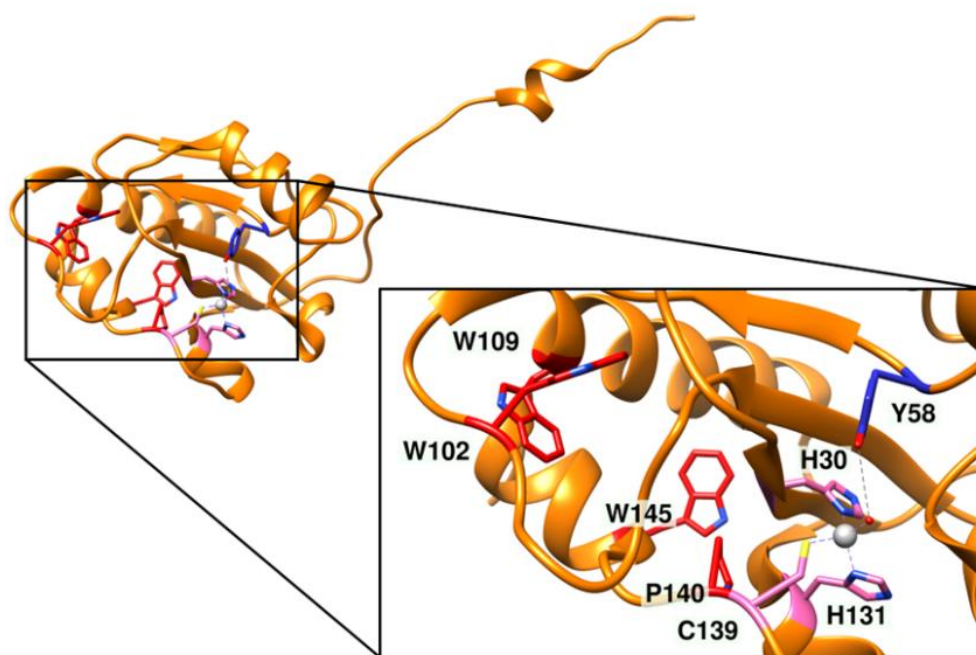
Do testu wykorzystałam PGN, który wyizolowałam z bakterii *T. thermophilus* HB8. Po inkubacji białka z peptydoglikanem i serii płukań otrzymałam dwie frakcje. Jedną z nich to supernatant, w której znajdowało się białko niezwiązane z PGNem. Z kolei druga frakcja, czyli osad, zawierała PGN z białkiem, które się do niego związało. Otrzymane frakcje rozdzieliłam przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE w żelu trycynowym. Kontrolę negatywną stanowiła anhidraza węglowa (CA), a pozytywną białko Ts2631 typu dzikiego.

Eksperyment ten nie wskazał jednoznacznie, że któraś z reszt o istotnie zredukowanej aktywności litycznej bierze udział w wiązaniu (Ryc. 22A). Zaobserwowałam jednak, że prążek odpowiadający wariantowi R20A jest prawie niewidoczny we frakcji osadu, a wyraźny we frakcji supernatantu. R20 jest ostatnią z sześciu arginin, jakie znajdują się na N-końcowym elastycznym regionie endolizyny Ts2631 (Ryc. 22C). Reszta R20 może być zaangażowana w interakcję z substratem i znajduje się w pobliżu reszt Y60 i K70, o których wiadomo, że odpowiadają za interakcję z PGNem (Ryc. 22D).

5.7 Podsumowanie analizy termostabilności endolizyny Ts2631

Początkowe porównanie sekwencji termostabilnej endolizyny z lizozymem T7 pochodzenia mezofilnego pokazały, że tyrozyn, tryptofanów, arginin, czy prolin jest zdecydowanie więcej w termofilnym białku. Po wykonaniu mutagenyzy miejscowo-specyficznej okazało się, że w przypadku 3 z 7 wariantów tryptofanowych: W102A, W109A i W145A T_m drastycznie się obniżyła. W przypadku wariantów prolinowych P140A miał zdecydowanie obniżoną wartość T_m w porównaniu do endolizyny Ts2631, a w przypadku wariantów argininowych nie zaobserwowałam tak wysokich spadków T_m , bo jedynie wariant R20A wykazał najniższą T_m , o 8,55°C niższą od niezmięnionej endolizyny.

Zaburzenie wiązania koordynującego jon Zn^{2+} któregośkolwiek z aminokwasów zaangażowanych bezpośrednio w to wiązanie także doprowadzało do utraty stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Reszty odpowiadające za stabilność termiczną białka znajdują się głównie na C-końcu białka i zlokalizowane są w obrębie rowka wiążącego PGN (Ryc. 23).



Ryc. 23. Struktura endolizyny Ts2631 ze zbliżeniem na reszty, których podstawienie skutkowało znacznym obniżeniem temperatury topnienia. Na czerwono zaznaczono: W102, W109, P140 i W145. Na różowo: H30, H131, C139, które bezpośrednio koordynują wiązanie jonu Zn²⁺ (szara kula) a ciemno niebieskim resztę Y58, która koordynuje ten jon przez H₂O (czerwona kulka).

Zastanawiało mnie, czy mechanizm odpowiadający za stabilność termiczną endolizyny Ts2631 może mieć szerszy kontekst i być taki sam u innych termicznie stabilnych amidaz typu 2. Nałożyłam struktury 13 najbliższych homologów strukturalnych endolizyny Ts2631 z bazy PDB oraz endolizyny PhiKo i białka z *Thermus* sp. o numerze akcesyjnym MDM7323587 (białko nie jest scharakteryzowane, wykonałam poglądowy model białka za pomocą AlphaFold3), które są amidazami typu 2 i porównałam ich sekwencje. Zaobserwowałam, że aa R20, W102, W109, P140 i W145 pokrywają się z tymi, które występują u: endolizyny Ph2119, endolizyny PhiKo i białka z *Thermus* sp. (MDM7323587) (Ryc. 24). Spośród nich arginina (R) występuje jeszcze tylko w lizozymie T7, natomiast prolina (P) jest silnie konserwowana i występuje we wszystkich amidazach typu 2, które zostały przedstawione w tej pracy. Jedynie każdy z trzech tryptofanów (W) istotnych w stabilności termicznej endolizyny Ts2631 pojawił się wyłącznie w sekwencjach białek termofilnych. Poza tym nie zaobserwowałam, by w pozostałych amidazach występowała inna reszta aromatyczna w pozycjach tryptofanu z jednym wyjątkiem. W pozycji W145 endolizyny Ts2631 białko LysC zawierało fenyloalaninę (F). Można więc przypuszczać, że tryptofan (W) ma najbardziej istotne znaczenie w przypadku stabilności termicznej amidaz typu 2. Możliwe więc, że zmiana odpowiadających w sekwencji aminokwasów białek mezofilnych poprawi ich stabilność termiczną.

6FHG	4	LEPWNRWYRQ	.KR.AYRV	R	LT.PIHYVVL	HHTAG...P	EN....Q..	38	Ts2631	
6SU5	31RQKGVYRI	.R	.GTPPHYIVL	HHTAG...P	VD....Q..	58	Ph2119		
-	12TWRH	.R	PV.DPAYIVL	HHTAG...P	VD....Q..	35	PhiKo		
-	12VWKA	.R	LG.KPRYIVL	HHTAG...P	VD....Q..	35	MDM7323587		
6SSC	54ATPLSYNF	..	NPNMIVY	HHTVD...N	.N....M..	77	LysC		
1YCK	15E.CAQH	.L	.SLPLRYVVV	SHTAG...S	SCNTPASCQQ	46	PGRP-S		
5XZ4	15K.SINY	.L	.IIPYVVI	HHTVT...A	ECNTRSECIA	46	PGRP-SA		
4Z8I	75N.YNVF	.L	.SLPVPKVI	HHSAG...A	TCSTQSSCSL	106	BbtPGRP3		
2RKQ	15NGAIDS	.M	.VTPLPRAVI	AHTAG...G	ACADDVTCSQ	47	PGRP-SD		
7NSX	15K.SVEH	.F	.QGPAPYVII	HHSYMP...A	VCYSTPDCMK	47	PGRP-LB		
2APH	16HCPK	.M	.NLPKYVII	IHTAG...T	SCTVSTDCQT	46	PGRP-IαC		
2F2L	14KRMIDA	.Q	.QLPINRVVI	SHTAA...E	GCESREVCSA	46	PGRP-ICa/LCx		
5XZ3	16K.NINY	.L	.IIPYVVI	HHTVS...L	ECNSKDTCSIS	47	PGRP-SA		
1LBA	1AKQ	.R	.E.STDAIFV	HCSAT.KPSQ	.N....V..	23	T7 lysozyme		
7NT0	18K.SVEH	.F	.QGPAPYVII	HHSYMP...A	VCYSTPDCMK	50	PGRP-LB		
2EAX	15HCPR	.M	.TLPKYGII	IHTAG...R	TCNISDECLR	45	PGRP-IβC		
6FHG	88	SICVAAVGDFSAGV	..	WPDDAPG	WRALWELKQA	LAK.A..YP.	124	Ts2631	
6SU5	108	SLCIAAVGDFSQGPA	..	WPDNAPG	WKALLELKDA	LVK.A..YP.	145	Ph2119	
-	85	AICIALVGNFVGGYP	.P	WNERAPG	WKSLAWLVRE	LRK.H..DSG	125	PhiKo	
-	85	SICIALVGNFARGYP	.P	WREALG	WKALAELVES	LER.G..HKD	125	MDM7323587	
6SSC	126	AFGIASEGNFNEEY	V..T...	PQQ	MTSLIALSRY	LMN.K..YN.	160	LysC	
1YCK	97	SIGISFMGNYMDRV	P..T...	PQA	IRAAQGLLAC	GVAQGALRS.	134	PGRP-S	
5XZ4	96	SVGIGFIGNFQEKA	A..S...	DKM	LNAAHALHC	GKSKGILRE.	133	PGRP-SA	
4Z8I	156	SIGICFMGDFTSQK	P..T...	ASA	IAAAKSLISC	GVSLGKIRS.	193	BbtPGRP3	
2RKQ	97	SLGIAFIGNFEERA	P..N...	KEA	LDAAKELLEQ	AVKQQLVE.	134	PGRP-SD	
7NSX	97	SVGIVLIGDWRTEL	P..P...	KQM	LDAAKNLIAF	GVFKGYIDP.	134	PGRP-LB	
2APH	96	ALGIAFIGYFVEKP	P..N...	AAA	LEAAQDLIQ	AVVEGYLTP.	133	PGRP-IαC	
2F2L	96	SIGISFIGTFTTRK	P..N...	ERQ	LEACQLLQE	GVRLLKLT.	133	PGRP-ICa/LCx	
5XZ3	97	SISIAFIGNFQNK	A..S...	NKM	LNAAHKLILC	GKSKGILRE.	134	PGRP-SA	
1LBA	72	SIGVCLVGGI	DDKGKFD	.AN	F..T...	PAQ	MQSLRSLVLT	LLA.K..YE.	111	T7 lysozyme
7NT0	100	SVGIVLIGDWRTEL	P..P...	KQM	LDAAKNLIAF	GVFKGYIDP.	137	PGRP-LB	
2EAX	95	ALGITFMGTFTGIP	P..N...	AAA	LEAAQDLIQ	AMVKGYLTP.	132	PGRP-IβC	
6FHG	124	.KA.LFVLHK	NLVPTECPGR	.LT.	W	ELI	Q...RKGGGG	Q.....	156	Ts2631
6SU5	145	.KA.VLVLHK	ELTQTCPGV	.LS.	W	GMV	A...EKGGK.	175	Ph2119
-	126	LRL.RLVRHK	DLRPTKCPGT	.VT.	W	EEA	L...VRGGVP	QE.QVETLKV	166	PhiKo
-	125	.GL.ALKLHK	ELRRTCPGV	.VT.	W	EEA	L...SRGGMP	PE.RIAAL	164	MDM7323587
6SSC	160	.ITDLKRHK	DVRQTECPGN	NF..PFEE..	IKA.....K.	..LNV.....	191	LysC	
1YCK	135	N.Y.VLKGHR	DVQRTLSPGN	QLYHLIQN..	W.....P..H.Y	164	PGRP-S	
5XZ4	134	D.I.RVIGAK	QVTATMSPGS	KLQKQIKN..	W.....L..E.W	163	PGRP-SA	
4Z8I	194	G.Y.SLYGHR	DVGSTACPGN	LLYDDIKS..	W.....G..R.Y	223	BbtPGRP3	
2RKQ	135	G.Y.KLLGHR	QVSATKSPGE	ALYALIQ..	W.....P..N.W	164	PGRP-SD	
7NSX	135	A.Y.KLLGHR	QVRDTECPGG	RLFAEISS..	W.....P..H.F	164	PGRP-LB	
2APH	134	N.Y.LLMGHS	DVVNLSPPGQ	ALYNIIST..	W.....P..H.F	163	PGRP-IαC	
2F2L	134	N.Y.RLYGHR	QLSATESPGE	ELYKIIKK..	W.....P..H.W	163	PGRP-ICa/LCx	
5XZ3	135	D.V.RVIGGK	QVIATLSPGF	ELYKQIQN..	W.....P..E.W	164	PGRP-SA	
1LBA	111	.GA.VLRAHH	EVAPKACPS.	.F.D.LKRW.	W.EKN.....	138	T7 lysozyme	
7NT0	138	A.Y.KLLGHR	QVRDTECPGG	RLFAEISS..	W.....P..H.F	167	PGRP-LB	
2EAX	133	N.Y.LLVGHS	DVARTLSPGQ	ALYNIIST..	W.....P..H.F	162	PGRP-IβC	

Ryc. 24. Fragmenty porównanych sekwencji białek po nałożeniu na siebie struktur endolizyny Ts2631 i jej strukturalnych homologów. Szarym kolorem zaznaczono R20, W102, W109, P140 i W145 z sekwencji endolizyny Ts2631 i identyczne aminokwasy białek homologicznych.

5.8 Poszukiwanie strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 o pochodzeniu mezofilnym

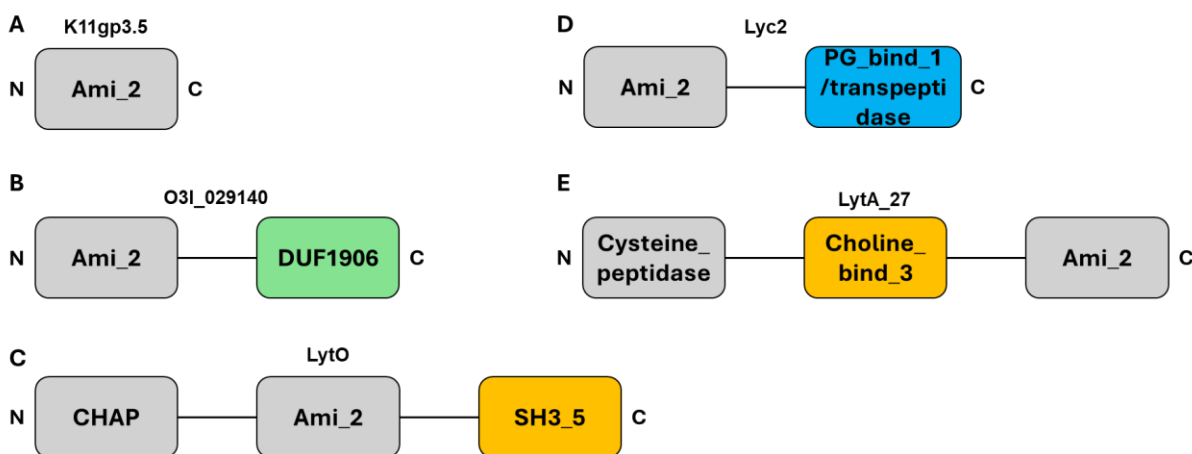
Postanowiłam zweryfikować hipotezę, czy można zwiększyć stabilność termiczną strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 pochodzenia mezofilnego bez ingerencji w ich aktywność.

Do poszukiwania strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 wykorzystałam początkowo PSI-BLAST protein (Position-Specific Iterated BLAST), za pomocą którego znaleziono endolizynę K11gp3.5. Do kolejnych poszukiwań wykorzystałam serwer Foldseek, który dokonuje porównania trójwymiarowego (3D) modelu białka z 7 różnymi bazami danych ze strukturami 3D (AlphaFold/Proteome, AlphaFold/Swiss-Prot, AlphaFold/UniProt50, CATH50, GMGCL, MGnify-ESM30, PDB100). Początkowo założyłam znalezienie 5 strukturalnych homologów, które będą endolizynami. Znalezienie w bazach danych pasujących wyników okazało się niemożliwe. Jednym ze znalezionych białek była endolizyna K11gp3.5 (znaleziona jeszcze przy tworzeniu projektu OPUS20, Tab. 6), która pochodzi z bakteriofaga K11 infekującego *Klebsiella pneumoniae*. Dodatkowym kryterium przy poszukiwaniu była informacja o tym, czy białka posiadają domeny transmembranowe. Miało to zapobiec ewentualnym problemom z oczyszczaniem białek. W tym celu wykorzystałam DAS, czyli serwer, który przewidywał występowanie takich domen. Po przeanalizowaniu baz danych wytypowałam pozostałe białka: autolizynę LytO z *Staphylococcus aureus*, autolizynę LytA_27 z *Clostridium beijerinckii*, autolityczny lizozym Lyc2 z *Clostridium felsineum* oraz prawdopodobną autolizynę O3I_029140 (w skrócie O3I) z *Nocardia brasiliensis* (Tab. 6).

Syntezę poszczególnych genów kodujących białka wymienione w Tab. 6. zamówiłam w firmie BioCat, która przygotowała konstrukty w wektorze pET-15b. Tam zamówiłam także niektóre warianty substytucyjne poszczególnych białek, o których będzie mowa później.

Tab. 6. Strukturalne homologi endolizyny Ts2631 pochodzenia mezofilnego.

L. p.	Nazwa białka	Typ białka	Il. aa	GenBank	Pfam/SUPFAM	Organizm źródłowy
1.	K11gp3.5	Endolizyna	151	ACF15848	Amidase_2	Bakteriofag K11
2.	O3I_029140	Białko będące amidazą	390	AFU03777	Amidase_2, DUF1906	<i>Nocardia brasiliensis</i> ATCC 700358/ HUJEG-1)
3.	LytO	Prawdopodobna autolizyna	481	ABD31075	Amidase_2, CHAP1, SH3_5	<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325 / PS 47)
4.	Lyc2/ CLFE_0289 60/ PGRP C. <i>felsineum</i>	Lizozym autolityczny/ hipotetyczne białko/ PGRP	256	OOL92448/ URZ16849/ WP_077892 889	Amidase_2, PG_binding_1	<i>Clostridium felsineum</i> DSM 794
5.	LytA_27	Autolizyna	535	OOM38505	Cysteine_peptidase, Amidase_2, Choline_bind_3	<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 791



Ryc. 25. Schematyczne przedstawienie domen strukturalnych homologów pochodzenia mezofilnego endolizyny Ts2631. A – K11gp3.5; B – O3I_029140; C – LytO; D – Lyc2; E- LytA_27. Na żółto oznaczone są domeny wiążące substrat, na szaro domeny katalityczne, na niebiesko o możliwie dwojakiej funkcji a na zielono o nieznannej funkcji (*ang. Domain of Unknown Function, DUF*). Linie pomiędzy nimi oznaczają linkery.

Porównałam ze sobą zawartość poszczególnych aminokwasów w sekwencjach endolizyny Ts2631 i domen białek będących jej strukturalnymi homologami pochodzenia mezofilnego skupiając się na argininach, tryptofanach i prolinach. Procentowy udział tych aminokwasów w sekwencjach białek mezofilnych był zauważalnie mniejszy niż u endolizyny Ts2631. Można było jednak zauważyć, że ilość tyrozyny w białku Lyc_2 wynosi 5,3%, czyli podobnie jak u endolizyny Ts2631, w której tyrozyna stanowi 5,8%, a w białku LytA_27 jest jej nawet więcej (6,8%). W przypadku pozostałych reszt, jak seryna, kwas asparaginowy i fenyloalanina zauważyłam, że częstość ich występowania jest większa, tak jak w przypadku lizozymu T7 (Ryc. 10C), w porównaniu do endolizyny Ts2631. Można więc zaobserwować podobny trend występowania aminokwasów w białkach pochodzenia mezofilnego w przypadku większości reszt (Tab. 7).

Tab. 7. Porównanie zawartości aminokwasów sekwencji aminokwasowej w endolizynie Ts2631 i domen amidazowych strukturalnie homologicznych do niej białek.

3-literowe oznaczenie aa	Ts2631	K11gp3.5	LytO	LytA_27	Lyc2	O3I
Ala	9,0%	7,9%	8,3%	6,1%	6,7%	8,9%
Arg	9,0%	6,0%	5,2%	2,7%	3,3%	6,1%
Asn	3,8%	3,3%	6,2%	10,8%	5,3%	6,1%
Asp	2,6%	6,0%	4,7%	4,1%	3,3%	8,9%
Cys	1,9%	2,0%	1,6%	2,7%	5,3%	1,7%
Gln	3,2%	6,0%	4,7%	2,7%	4,7%	3,3%
Glu	5,8%	4,6%	4,7%	5,4%	6,0%	3,9%

Gly	7,7%	9,9%	8,3%	10,8%	11,3%	10,0%
His	4,5%	4,6%	3,1%	4,7%	5,3%	2,2%
Ile	4,5%	4,0%	5,7%	6,8%	6,7%	4,4%
Leu	8,3%	5,3%	8,3%	4,1%	6,0%	7,2%
Lys	5,1%	6,0%	7,8%	5,4%	6,7%	1,7%
Met	0,6%	2,6%	1,6%	4,1%	2,7%	0,6%
Phe	1,9%	3,3%	2,6%	2,7%	2,0%	2,2%
Pro	8,3%	3,3%	4,7%	4,1%	4,7%	5,0%
Ser	1,3%	5,3%	5,7%	6,1%	6,0%	8,9%
Thr	3,8%	6,0%	5,2%	4,1%	2,7%	6,1%
Trp	4,5%	2,0%	1,6%	2,7%	1,3%	3,3%
Tyr	5,8%	2,0%	4,1%	6,8%	5,3%	3,9%
Val	8,3%	9,9%	6,2%	3,4%	4,7%	5,6%

Ze względu na problemy z oczyszczaniem białka O3I_029140 tego białka w ogóle nie scharakteryzowałam. Białko Lyc2 udało się scharakteryzować natomiast jego wariant substytucyjny znajdował się we frakcji nierozpuszczalnej i nie byłam w stanie dokończyć analizy porównawczej. Z kolei dla wariantu białka LytA_27 nie określiłam aktywności wariantu substytucyjnego tego białka. Dlatego na kolejnych stronach pracy przedstawię wyniki skupiające się na endolizynie K11gp3.5 oraz autolizynie LytO. Dla białka O3I omówię jedynie analizę bioinformatyczną, a potem przedstawię charakterystykę białek LytA_27 i Lyc2.

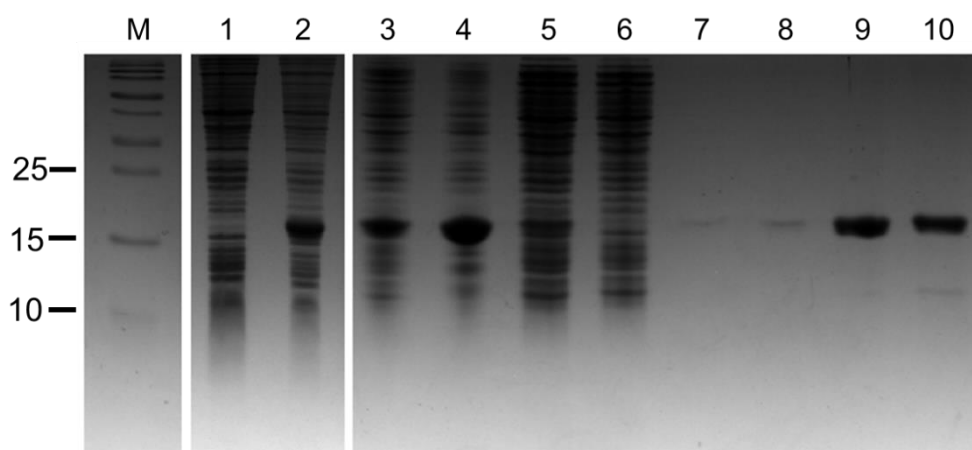
5.9 Endolizyna K11gp3.5

5.9.1 Nadprodukcja i oczyszczanie białka

Endolizyna K11gp3.5 pochodzi z bakteriofaga K11, który infekuje bakterie *Klebsiella pneumoniae*. Została ona przetestowana już we wcześniejszych badaniach grupy Prof. Zuzanny Drulis-Kawy i Prof. Roba Lavigne¹⁸³. Testowano wówczas 5 różnych endolizyn przeciw bakterii *P. aeruginosa* PAO1. Endolizyna K11gp3.5 o stężeniu 1,5 μ M (25 μ g/mL) z dodatkiem 0,5 mM EDTA wykazała redukcję ilości bakterii o 2,08 jednostek logarytmicznych po 30 minutowej reakcji w 22°C¹⁸³.

Po otrzymaniu konstruktów plazmidu z genem kodującym endolizynę K11gp3.5 przeprowadziłam transformację chemiczną komórek *E. coli* BL21(DE3) oraz *E. coli* DH5 α . Endolizynę K11gp3.5 nadprodukowałam oraz oczyściłam według warunków, jakie podano w innych badaniach nad tą endolizyną. Po doprowadzeniu hodowli *E. coli* BL21(DE3) z plazmidem kodującym gen *k11gp3.5* do OD₆₀₀ ~0,4 hodowlę zaindukowałam 1 mM IPTG i kontynuowałam ją jeszcze przez 4 godziny w 37°C¹⁸³. Nadprodukcja w systemie

ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) przebiegła z wystarczającą wydajnością. Następnie oczyściłam białko, a próbki z każdego etapu oczyszczania poddałam elektroforezie SDS-PAGE. Obserwując żel po elektroforezie zauważyłam, że na etapie płukania złoża związanego z białkiem buforem z 20 mM imidazolem jest widoczny cienki prążek odpowiadający wielkości endolizynie K11gp3.5. Dlatego przy kolejnym oczyszczaniu białka złoża płukałam już tylko buforem z 10 mM imidazolem, by zapobiec przedwczesnemu wypłukaniu białka z kolumny. Prążek odpowiadający wielkości białka znajduje się na wysokości około 18,5 kDa (Ryc. 26), czyli wielkości białka ze znacznikiem histydynowym. Stężenie jakie otrzymałam to 1,2 mg/mL. Na późniejszych etapach badań zmieniałam warunki nadprodukcji, gdyż zauważyłam, że przy indukcji hodowli 0,5 mM IPTG i wytrząsaniu w 18°C przez 16 godzin wydajność oczyszczania wzrosła około 10-krotnie i otrzymywałam białko o stężeniu około 10 mg/mL.



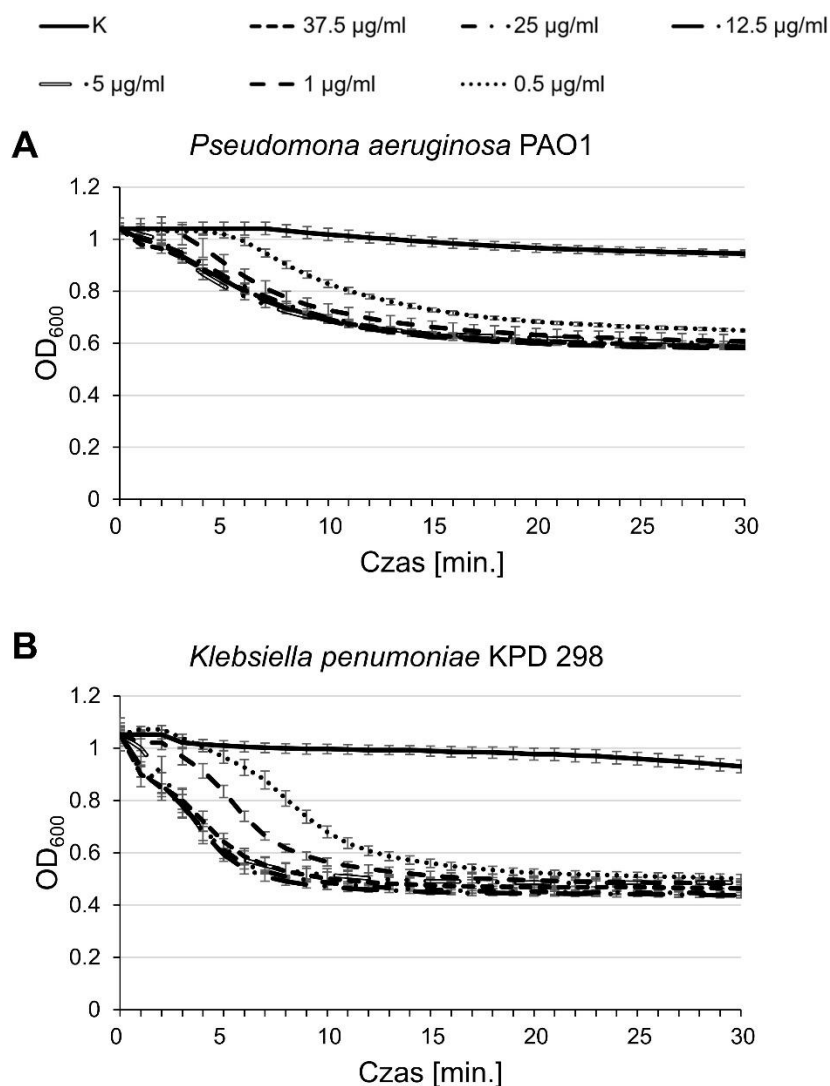
Ryc. 26. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka K11gp3.5. Nadprodukcja rekombinowanego białka K11gp3.5 w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu PBS, pH 7,4. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%).

5.9.2 Testy aktywności

Ze względu na to, że grupa badawcza Prof. Zuzanny Drulis-Kawy i Prof. Roba Lavigne w swoich badaniach egzaminowała działanie endolizymy tylko wobec *P. aeruginosa* PAO1¹⁸³, a endolizyna K11gp3.5 pochodzi z bakteriofaga infekującego *K. pneumoniae* zdecydowałam się najpierw sprawdzić, który szczep lepiej wykorzystać w dalszych badaniach.

5.9.2.1 Test aktywności endolizyny K11gp3.5

Pierwszym krokiem był wybór szczepu, który będzie służył do dalszych testów endolizyny K11gp3.5. Białko doprowadziłam do różnych stężeń w zakresie od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 37,5 $\mu\text{g/mL}$. Przeprowadziłam reakcję TRZ, która trwała 30 minut. Wykazałam, że już po 15 minutach wartość OD_{600} spadała do około 0,6 w przypadku szczepu *P. aeruginosa* PAO1 (Ryc. 27A) i 0,45 w przypadku *K. pneumoniae* KPD 298 (Ryc. 27B) i utrzymywała się na podobnym poziomie do końca trwania eksperymentu (Ryc. 25). Odnotowałam, że różnice w działaniu enzymu o stężeniach: 5 - 37,5 $\mu\text{g/mL}$ są nieznaczne, dlatego w dalszych testach wykorzystałam endolizynę o stężeniu 5 $\mu\text{g/mL}$ oraz szczep *K. pneumoniae* KPD 298.



Ryc. 27. Test aktywności endolizyny K11gp3.5 wobec dwóch różnych gatunków bakterii. Do eksperymentu wykorzystano przygotowane substraty bakteryjne z permeabilizowaną błoną zewnętrzną. Test wykonano w zakresie stężeń od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 37,5 $\mu\text{g/mL}$ w buforze PBS pH 7,4 przez 30 minut w 37°C.

A – test wykonany na substracie *P. aeruginosa* PAO1. B - test wykonany na substracie *K. pneumoniae* KPD 298. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach a słupki błędu wskazują na odchylenie standardowe.

5.9.3 Porównanie sekwencji endolizyn Ts2631 i K11gp3.5

Za pomocą ClustalO porównałam sekwencje aminokwasowe endolizyny Ts2631 z endolizyną K11gp3.5 (Ryc. 28). Aminokwasom W102, W109, P140 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 zaangażowanym w termostabilność odpowiadały kolejno N91, M101, P132 i Q137 w sekwencji endolizyny K11gp3.5. W przypadku P140 spodziewałam się, że w sekwencji endolizyny K11gp3.5 także znajdzie się prolina, która jest konserwowanym aminokwasem wśród amidaz typu 2 (Ryc. 24). Pierwszy wariant substytucyjny jaki powstał to: K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W. Przygotowanie konstruktów plazmidowych kodujących wariant endolizyny K11gp3.5 zleciłam firmie BioCat.

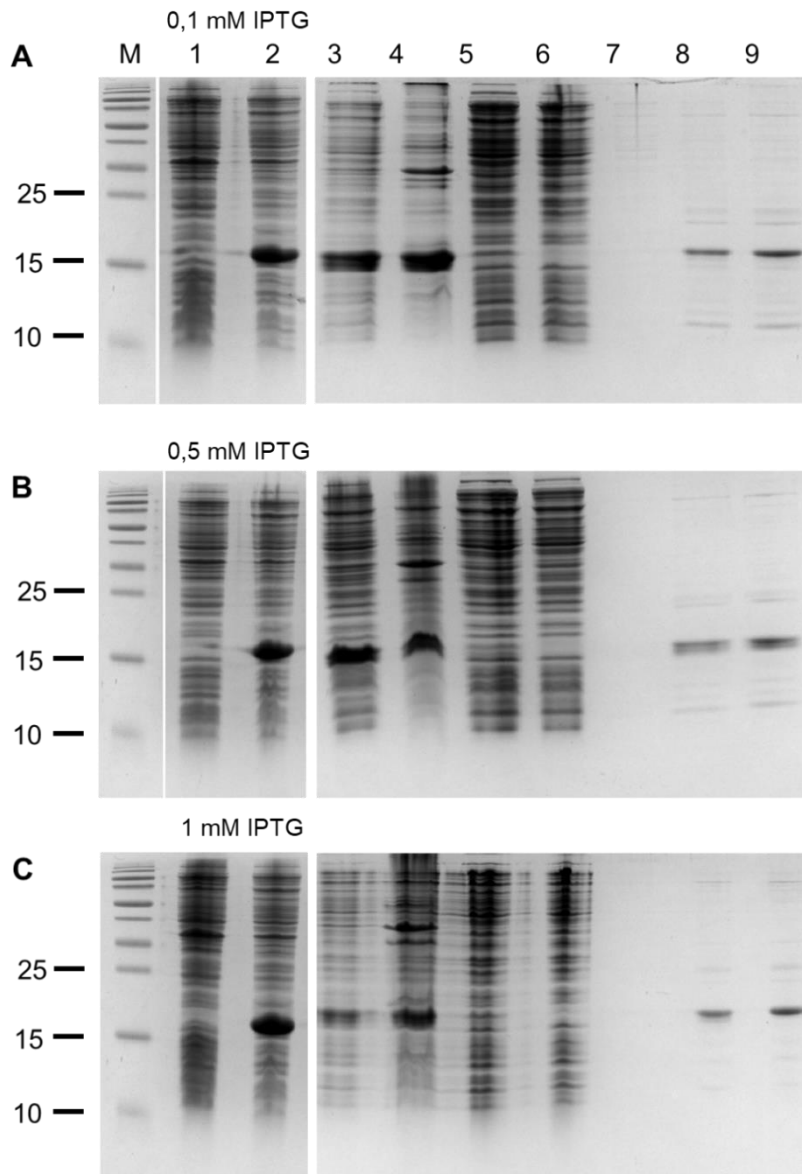
Ts2631	1	MRILEFWNFW	YRQKRAYFVR	LTPIHYVVLH	HTA--GFENQ	TPEAIKRYHE	EARGWPHIG
K11gp3.5	1	-----	-MAKVQFTKR	QET-SQIFVH	CSATKANMDV	GVREIRQW-H	KEQGWLVDG
Ts2631	59	HYIVYRDGRV	YKTLFENAVP	ICVRENFVVS	ICVAAVGDFS	AGVWDDA--	-PQWFAIWE
K11gp3.5	48	HFIIRDGTIV	EAGRDQDAVG	SHVKGYNSTS	VGVCIVGGID	AKCNPEANFT	PQMSAING
Ts2631	116	KÇAIAKAYPK	ALFVLHKNIV	PTECFGRITW	EL-----IQ	RKGGGGQ	156
K11gp3.5	108	LHELGRGTYPK	AVIMAHHDVA	PKACEFSDIQ	RWVKTGEIVT	SDRG---	151

Ryc. 28. Porównanie sekwencji endolizyn Ts2631 i K11gp3.5. Zaciemnione reszty wskazują na podobieństwo aminokwasów. Czerwonymi prostokątami zaznaczono aminokwasy, które zaangażowane są w stabilność termiczną endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji endolizyny K11gp3.5.

5.9.4 Nadprodukcja i oczyszczanie wariantu endolizyny K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W

Ponownie, po otrzymaniu interesującego mnie konstruktów przesłałam do transformacji chemicznej komórki *E. coli* BL21(DE3) oraz *E. coli* DH5a. Następnie przesłałam do nadprodukcji, gdzie początkowo dobrałam takie warunki, jak w przypadku pierwszych podejść do nadprodukcji endolizyny K11gp3.5, jednak podczas oczyszczania wariant nie uległ elucji. Było to prawdopodobnie spowodowane obecnością białka w warstwie z osadem, a w części rozpuszczalnej znajdowała się ilość poniżej progu wykrywalności. Znany jest fakt, że wysoki poziom ekspresji białek rekombinowanych w *E. coli* może prowadzić do formowania nierozpuszczalnych agregatów białek w postaci osadu¹⁸⁴. Można temu zaradzić poprzez zmianę warunków nadprodukcji. Dlatego obniżyłam temperaturę indukowanej hodowli z 37°C do 18°C i dodałam IPTG w trzech różnych stężeniach końcowych: 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM, po czym prowadziłam hodowlę przez 16 godzin. Po zmianie warunków nadprodukcji poziom wydajności oczyszczania w każdym wariantcie był podobny (Ryc. 29). Podczas oczyszczania

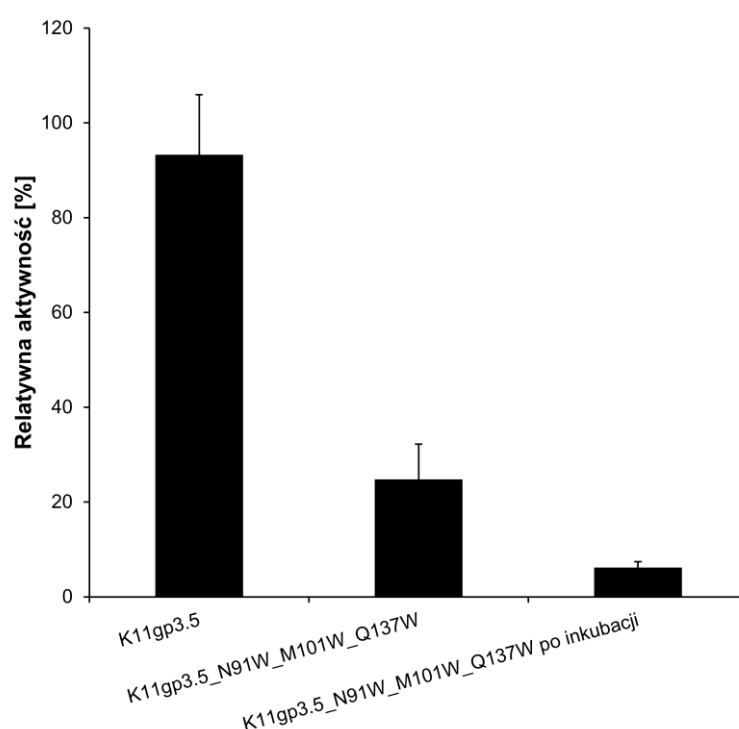
udało mi się uzyskać stężenie białka odpowiednie do przeprowadzenia dalszych testów. Ostatecznie przy kolejnych nadprodukcjach zdecydowałam się na następujące warunki indukcji: 0,5 mM IPTG, 18°C, 16 godzin.



Ryc. 29. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczanie wariantu rekombinowanego białka K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W. Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 0,1 mM IPTG (**A**), 0,5 mM IPTG (**B**) oraz 1 mM IPTG (**C**) przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – elucja białka ze złoża, 9 – dializa do buforu PBS, pH 7,4. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).

5.9.5 Analiza aktywności wariantu endolizyny K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W

Wykonałam TRZ, w którym sprawdziłam aktywność wariantu substytucyjnego. Warunki eksperymentu były takie same, jak dla białka typu dzikiego K11gp3.5, która stanowiła kontrolę pozytywną. Dodatkowo wariant substytucyjny poddałam inkubacji w 50°C przez 15 minut, a następnie schłodziłam przez 1 minutę w lodzie, by białko mogło się ewentualnie powtórnie sfałdować. Wariant K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W okazał się być aktywny na poziomie 24,78% w stosunku do endolizyny K11gp3.5, a po inkubacji w 50°C aktywność ta wyniosła zaledwie 6,21% (Ryc. 30). Świadczy to o zaburzeniu aktywności litycznej białka i możliwym osłabieniu jego stabilności termicznej.



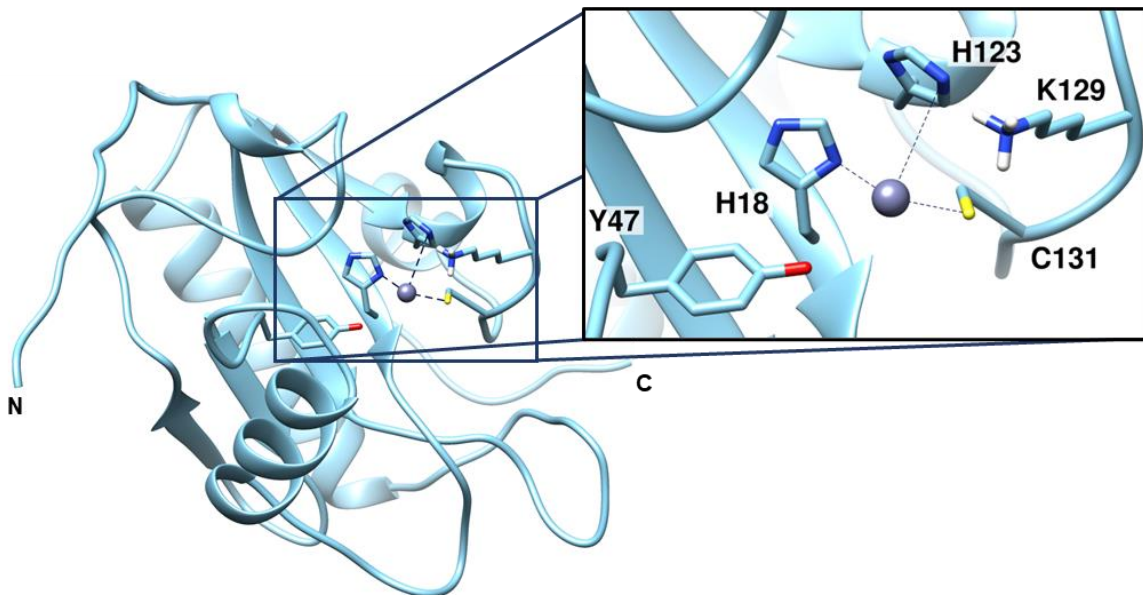
Ryc. 30. Porównanie aktywności endolizyny K11gp3.5 i jej wariantu K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W. Wariant endolizyny dodatkowo został poddany 15-minutowej inkubacji w 50°C, schłodzony w lodzie i następnie poddany testowi redukcji zmętnienia. Aktywność lityczna wariantu substytucyjnego w stopniu znacznym odbiega od endolizyny typu dzikiego.

Ze względu na powyższy wynik zdecydowałam się wykonać bardziej szczegółową analizę bioinformatyczną białka i wykonałam jego trójwymiarowy (3D) model.

5.9.6 Trójwymiarowy model endolizyny K11gp3.5

Za pomocą metod *in silico* wykonałam model 3D endolizyny K11gp3.5. Wykorzystane do tego algorytmy obliczeniowe znajdują się w Tab. 4. W wyniku analizy zidentyfikowałam potencjalne miejsce aktywne, w tym miejsce koordynujące jon Zn^{2+} (H18, H123, C131) (Ryc.

31). Wykazałam także, że endolizyna może prawdopodobnie odpowiadać za interakcję z sodem, a reszty możliwie w to zaangażowane, to kolejno: E39, W42, K43, R61, S66, H123, H124, A127 i K129. Z kolei za interakcję z peptydoglikanem mogą odpowiadać takie reszty jak: M101, N105, L108, H109, E110, R112, A118, W139, G143, E144 i L145.



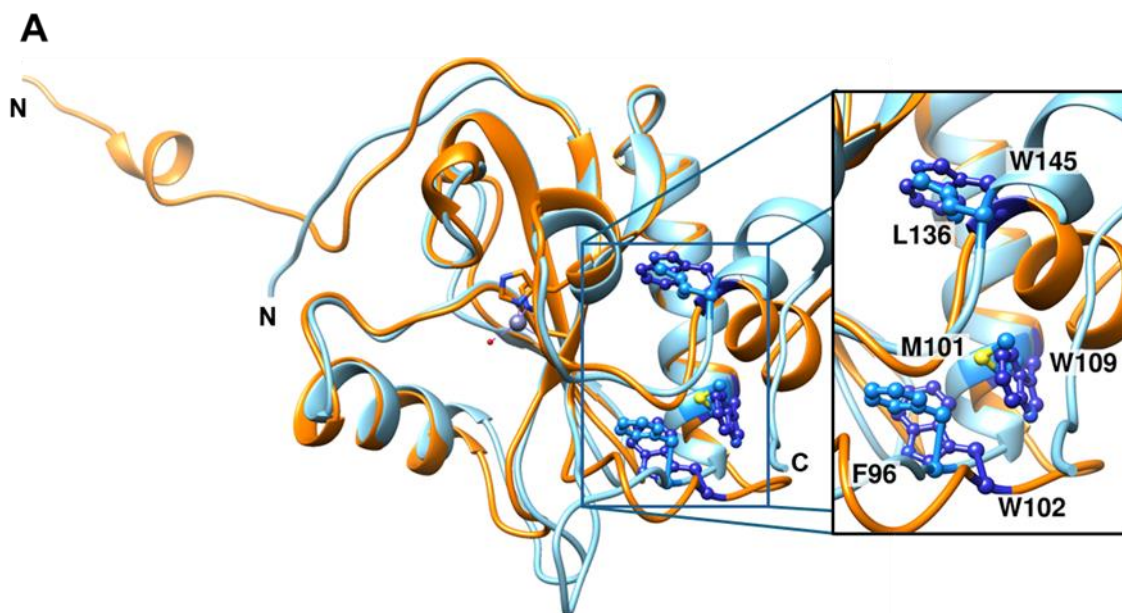
Ryc. 31. Trójwymiarowy model endolizyny K11gp3.5. Na powiększeniu zaznaczono centrum katalityczne w skład którego wchodzi triada koordynująca jon Zn^{2+} : His18, His123, Cys131. Jon Zn^{2+} zaznaczony jest szarym kolorem.

Podczas analizy bioinformatycznej wykazałam, że reszta M101, która w wariacie endolizyny K11gp3.5 została zastąpiona tryptofanem, może odpowiadać za wiązanie z PGNem. Nałożyłam na siebie strukturę przestrzenną endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG) i model endolizyny K11gp3.5 (Ryc. 32A). Po wykonaniu porównania sekwencji nałożonych struktur wykazałam różnicę w stosunku do programu ClustalO (Ryc. 32B).

Białka Ts2631 i K11gp3.5 nie wykazują wysokiego podobieństwa w sekwencji, bo zaledwie 33,66% (według NCBI BLASTp). Gdy podobieństwo sekwencji jest niskie, to metody oparte na strukturze mogą zapewnić lepsze dopasowanie sekwencji, niż te oparte na samym podobieństwie sekwencji¹⁸⁵. W wyniku tych obserwacji zdecydowałam o skonstruowaniu jeszcze kolejnych wariantów, tym razem bez zamieniania metioniny:

- K11gp3.5_N91W_Q137W,
- K11gp3.5_F96W_L136W.

Wariant K11gp3.5_N91W_Q137W wykonałam po porównaniu sekwencji w ClustalO natomiast wariant K11gp3.5_F96W_L136W po porównaniu sekwencji nałożonych na siebie modelu endolizyny K11gp3.5 i struktury endolizyny Ts2631. Synteza genów i przygotowanie konstruktów z genami kodującymi odpowiednie białka zleciłam firmie BioCat.



B

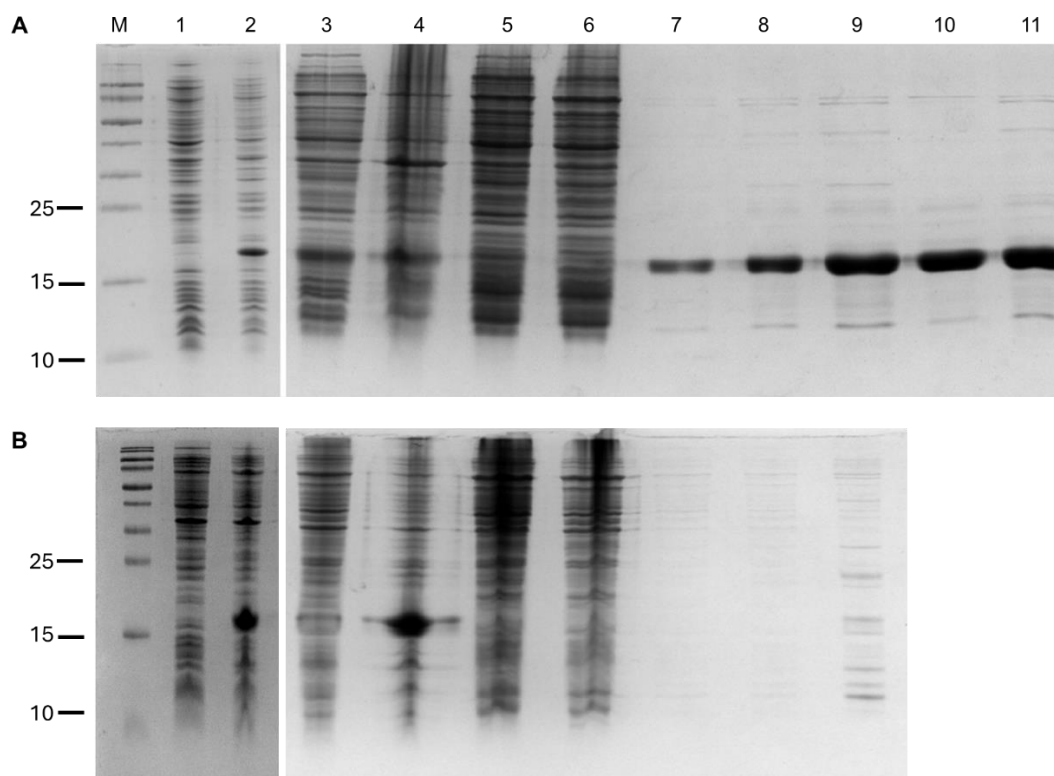
Ts2631	1	MRILEFWRW	YRQKRAYRVR	LTPIHYVVLH	HTA--GPNQ	TPEAIKRYHE	EARGWPHIG
K11gp3.5	1	-----	-MAKVQFTKR	QET-SQIFVH	CSATKANMDV	GVREIRQW-H	KEQGWLTVG
Ts2631	59	HYIVYRDGRV	YKTLFNNAV	ICVREFNFVS	ICVAAVGDFS	AGWEDDA--	-PCWRALWE
K11gp3.5	48	HFIIRDGTIV	EAGRDQDAVG	SEVKGYNSTS	VGVCIVGGID	AKNNEANFT	PQCMSALNG
Ts2631	116	KQALAKAYPK	ALFVLEKNIV	PTECFGRITW	EL-----IQ	RKGGGGQ	156
K11gp3.5	108	LHELRGTYPK	AVIMAHHDVA	PKACEFSDIQ	RWVKTGELVT	SDRG---	151

Ryc. 32. Porównanie struktury przestrzennej endolizyny Ts2631 i modelu endolizyny K11gp3.5 oraz ich sekwencji aminokwasowych. A – Nałożone na siebie modele endolizyn Ts2631 (na pomarańczowo) oraz K11gp3.5 (na niebiesko). Na powiększeniu zaznaczono aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz F96, M101 i L136 w sekwencji endolizyny K11gp3.5. B – Porównanie sekwencji aminokwasowych obu endolizyn za pomocą ClustalO z zaznaczonymi resztami odpowiadającymi sobie w sekwencji, które u endolizyny Ts2631 są istotne z punktu widzenia stabilności termicznej.

5.9.7 Nadprodukcja i oczyszczanie K11gp3.5_N91W_Q137W oraz K11gp3.5_F96W_L136W

Po otrzymaniu plazmidów z genami kodującymi odpowiednie warianty białek przeprowadziłam transformację chemiczną *E. coli* BL21(DE3) oraz *E. coli* DH5α. Po udanej

transformacji przeszłam do nadprodukcji białek. Oba warianty endolizyny K11gp3.5 indukowałam w 18°C poprzez dodanie 0,5 mM IPTG (Ryc. 33). Wariant K11gp3.5_N91W_Q137W oczyszczał się bez problemu. W przypadku wariantu K11gp3.5_F96W_L136W napotkałam problemy z oczyszczaniem białka, które po przeprowadzeniu sonikacji znajdowało się we frakcji nierozpuszczalnej (Ryc. 33B).

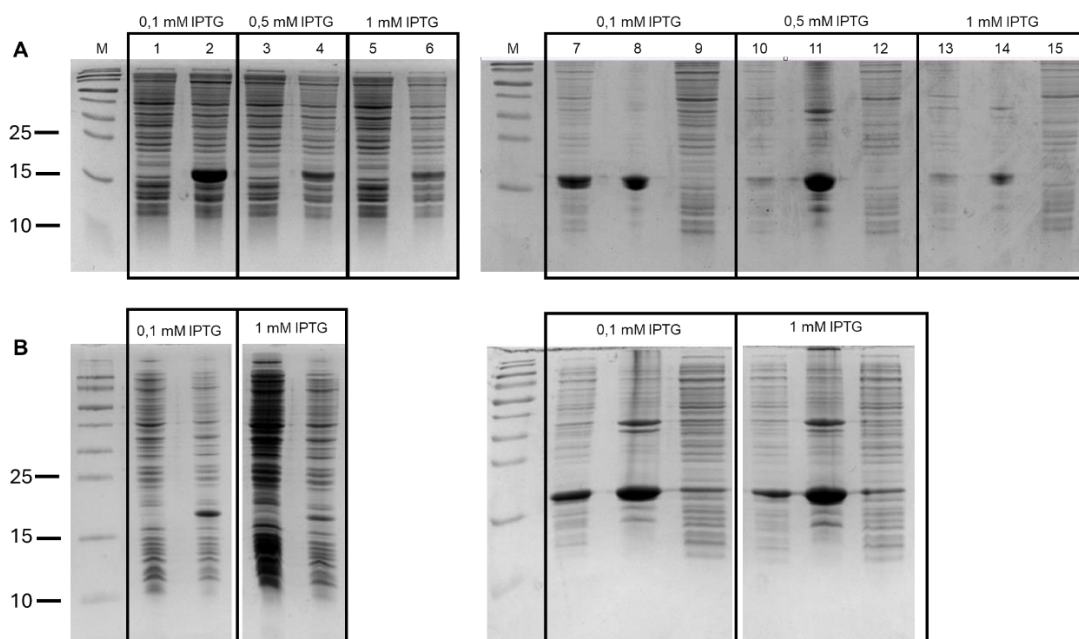


Ryc. 33. Nadprodukcja i oczyszczanie wariantów rekombinowanego białka K11gp3.5. **A** – K11gp3.5_N91W_Q137W; **B** – K11gp3.5_F96W_L136W. Nadprodukcja rekombinowanych wariantów białka K11gp3.5 w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 0,5 mM IPTG przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie ich metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – elucja białka ze złoża, 9 – dializa do buforu PBS, pH 7,4, 10 – elucja, 11 – dializa do buforu 20 mM HEPES, pH, 7,4, 10% glicerol. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).

Postanowiłam zmienić warunki nadprodukcji poprzez hodowlę w 30°C i indukcji IPTG o stężeniach 1, 0,5 i 0,1 mM. Po przeprowadzeniu sonikacji i zwirowaniu lizatów białko nadal obserwowałam tylko w osadzie (Ryc. 34A)

Sprawdziłam, czy nadprodukcja w 18°C przy indukcji IPTG o stężeniu 1 i 0,1 mM mogła przyczynić się do tego, by białko znalazło się we frakcji rozpuszczalnej. Tutaj zauważyłam

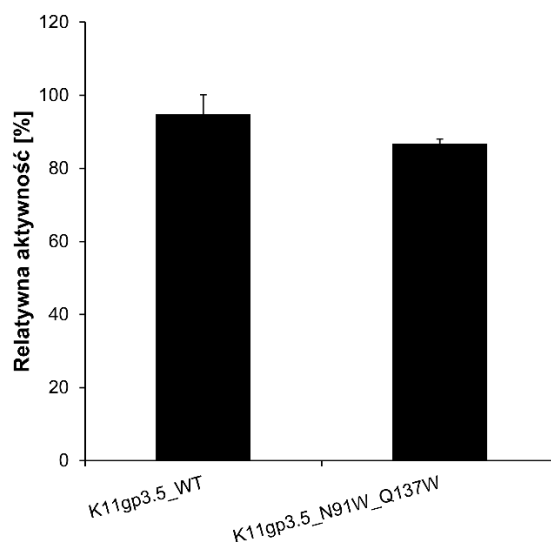
niewielki prążek w supernatancie (Ryc. 34B). Ze względu na brak postępu w oczyszczaniu białka zaprzestałam prób jego oczyszczania i podjęłam decyzję o przejściu do analizy kolejnego białka. Przy kolejnych próbach oczyszczania białka można będzie wykorzystać inne metody, np. dodanie plazmidu kodującego białka opiekuńcze, które także się nadprodukuje, albo wyindukowanie naturalnych białek opiekuńczych poprzez podniesienie temperatury do 42°C na 20 minut przed indukcją.



Ryc. 34. Optymalizacja nadprodukcji wariantu rekombinowanego białka K11gp3.5_F96W_L136W. Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) A – po indukcji 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM IPTG w 30°C; B – po indukcji 0,1 i 1 mM IPTG w 18°C. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i początkowych etapów oczyszczania: 1, 3 i 5 – przed indukcją, 2, 4 i 6 – po indukcji, 7, 10 i 13 – lizat, 8, 11 i 14 – osad, 9, 12 i 15 – supernatant. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).

5.9.8 Analiza aktywności i temperatury topnienia endolizyny K11gp3.5 oraz jej wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W

Aktywność lityczną białek sprawdziłam za pomocą TRZ. Białka K11gp3.5 i K11gp3.5_N91W_Q137W doprowadziłam do stężenia 5 µg/mL i testowałam aktywność w buforze B (PBS, pH 7,4) na substracie *K. pneumoniae* z permeabilizowaną błoną zewnętrzną. Test prowadziłam przez 30 minut w 37°C. Analiza ujawniła, że różnica w aktywności między wariantem a białkiem typu dzikiego jest niewielka. Aktywność wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W w stosunku do endolizyny typu dzikiego wyniosła 86,79 % ± 1,25 (Ryc. 35).



Ryc. 35. Test aktywności endolizyny K11gp3.5 i wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W. Do testu redukcji zmętnienia wykorzystano substrat bakteryjny *K. pneumoniae*. Białko doprowadzono do stężenia 5 $\mu\text{g/mL}$ w buforze PBS, pH 7,4 a eksperyment przeprowadzono w 37°C przez 30 minut.

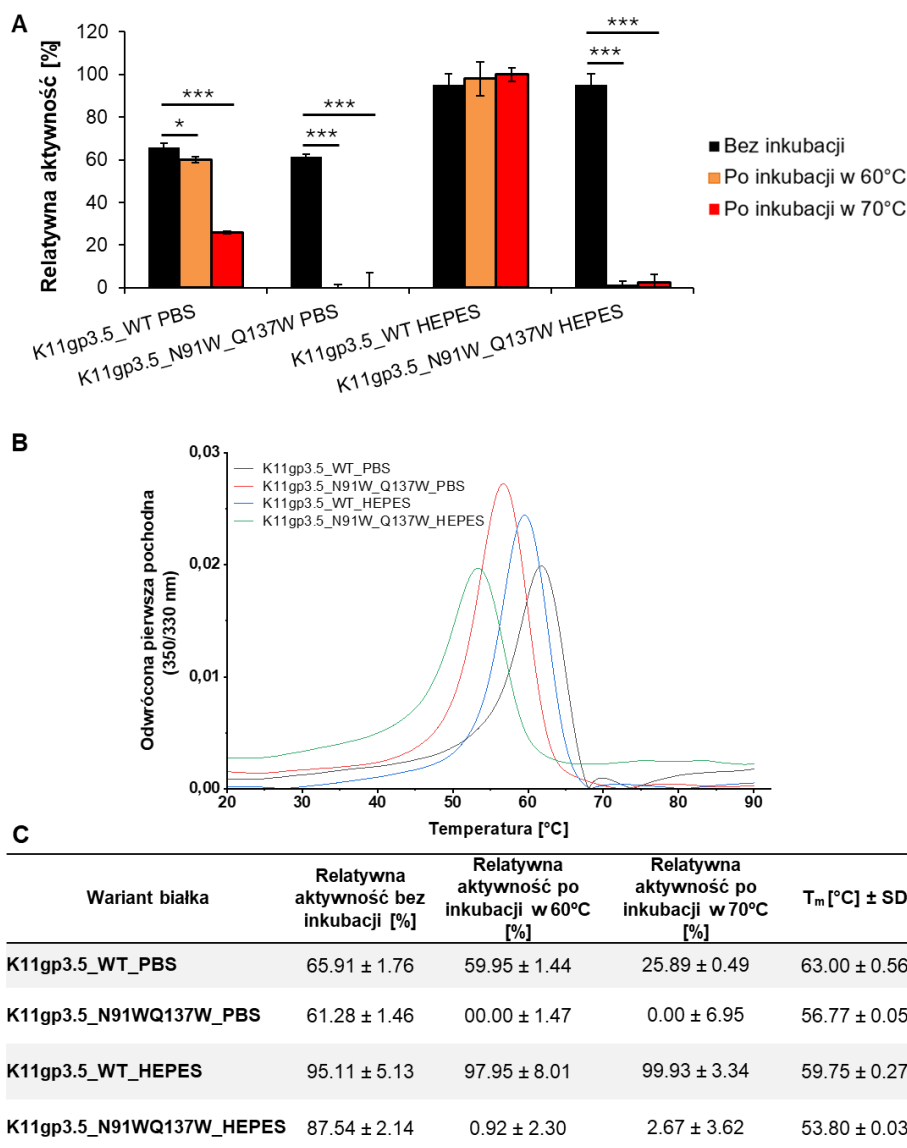
Ze względu na to, iż wariant okazał się aktywny zdecydowałam, że można podjąć się analizy nanoDSF. Białka do analizy aktywności oraz temperatury topnienia za pomocą nanoDSF przedializowałam do dwóch buforów wymienionych w Tab. 5. Bufor A (20 mM HEPES, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,4) wykorzystałam w celu możliwości porównania wartości T_m z endolizyną Ts2631. Wartość T_m dla endolizyny K11gp3.5 wyniosła 59,75°C w buforze A, natomiast w buforze B (PBS, pH 7,4) 63,00°C. Wariant K11gp3.5_N91W_Q137W miał obniżoną T_m w stosunku do K11gp3.5 wykazując T_m kolejno 53,8°C i 56,77°C (Ryc. 36B, C). Natomiast oba białka wykazały wyższą wartość T_m w buforze PBS. Tym samym nie udało się podnieść T_m wariantu substytucyjnego endolizyny K11gp3.5, a nawet doprowadziłam do jej obniżenia.

Prawdopodobnie głównym czynnikiem, jaki wpłynął na obniżenie T_m w wariacie substytucyjnym, jest mutacja Q137W, ze względu na jej lokalizację (drugi aminokwas w α -helisie). Natomiast mutacja N91W zlokalizowana jest na pętli i raczej wnosi tylko lokalny wkład destabilizujący. Pierwotne założenie wstawienia tryptofanu w miejsce glutaminy prezentowało się optymistycznie, ponieważ w okolicy 5 Å znajdowały się inne aa hydrofobowe, w tym W139, a także dodatnio naładowane aa (arginina i lizyna). Glutamina (Q) często występuje w miejscu inicjacji α -helisy, tutaj jako drugi aminokwas w tej strukturze może być kluczowy w jej stabilizacji (tzw. N-capping)¹⁸⁶. Tryptofan (W) z kolei nie pełni funkcji stabilizującej helisy i może prowadzić do lokalnego napięcia, jeśli powstałaby interakcja z W139 ($\pi - \pi$). Mogło to nie wpłynąć znacząco na aktywność białka, jednak na obniżenie T_m

już tak. Z kolei substytucja N91W mogła wprowadzić zaburzenie w dynamice pętli, ponieważ duży aminokwas został wprowadzony pomiędzy G90 i P92. Na dodatek w tym miejscu tryptofan nie ma partnera do interakcji.

Wykonałam jeszcze testy aktywności, w których porównałam działanie białka po 15-minutowej inkubacji białka w 60°C i 70°C z białkiem nieinkubowanym w tej temperaturze. Białka po podgrzaniu były chłodzone w lodzie a następnie przeprowadziłam TRZ według wcześniej opisanych warunków. Test wykonałam już w dwóch buforach, aby sprawdzić, czy w tej sytuacji też zaobserwuję różnice pomiędzy aktywnością w różnych buforach.

Wariant K11gp3.5_N91W_Q137W po inkubacji białka zarówno w 60°C, jak i 70°C nie wykazywał żadnej aktywności (Ryc. 36A). Z kolei aktywność białka w buforze A (20 mM HEPES, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,4) i B (PBS, pH 7,4) istotnie się od siebie różniła. Jako 100% aktywności przyjąłam aktywność K11gp3.5 typu dzikiego w buforze A i do niej porównywałam pozostałe wyniki. Aktywność endolizyny K11gp3.5 w buforze A w zależności od temperatury różniła się od siebie w 60°C i 70°C kolejno o 2,84% i 4,82%, co nie jest istotną statystycznie różnicą. Z kolei aktywność w buforze B wyniosła 65,91% bez inkubacji a po inkubacji białka w 60°C i 70°C spadała kolejno do 59,95% i 25,89% (Ryc. 36A, C).



Ryc. 36. Test aktywności oraz analiza nanoDSF endolizyny K11gp3.5 i wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W w dwóch różnych buforach i temperaturach. A – W teście redukcji zmętnienia (TRZ) białka doprowadzono do stężenia 5 µg/mL i dodawano do substratu z komórek *K. pneumoniae*. Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C w buforze HEPES (20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl) oraz PBS (PBS, pH 7,4); B – wykres przedstawiający krzywą określającą temperaturę topnienia (T_m) uzyskanej po przeprowadzeniu nanoDSF; C – tabela porównująca wyniki z testu aktywności w zależności od temperatury, w jakiej białko było inkubowane przed TRZ oraz przedstawiająca T_m wariantów białka w poszczególnych buforach.

Efekt działania PBS jest silnie zależny od rodzaju białka i jego budowy. Badania pokazują, że PBS może zmienić otoczenie jonowe, dzięki połączeniu stężenia NaCl (137 mM) z fosforanami (wielowartościowe jony) może sprzyjać stabilizacji struktury, ale jednocześnie zaburzać interakcje z substratem. Dodatkowe interakcje między buforem a białkiem mogą wpływać na obniżenie dynamiki konformacyjnej struktury, co przekłada się na wyższą wartość T_m jednocześnie ograniczając dynamikę zmian konformacyjnych potrzebnych dla aktywności białka¹⁸⁷. Sam bufor HEPES należy do tak zwanych „Good’s buffers” – tak zaprojektowanych,

by jak najmniej wchodzić w interakcje z białkami i jonami. Biorąc pod uwagę skład buforu A, czyli HEPES z dodatkiem NaCl i glicerolu w niskich stężeniach, to stabilizacja białka jest bardzo niewielka i nie ma zauważalnego wpływu na obniżenie dynamiki konformacyjnej białka a tym samym na jego aktywność.

5.10 LytO

Białko LytO to autolizyna, która pochodzi ze *S. aureus* subsp. *aureus* NTCC 8325. Zostało ono już wstępnie opisane przez grupę Prof. Karla E. Griswolda. Określono, że jest to białko, które składa się z 3 domen; dwóch domen katalitycznych: CHAP (23 – 147 aa) i PGRP (199 – 324 aa) oraz jednej domeny wiążącej PGN SH3_5 (395 – 460 aa). Zbadano całe białko oraz jej domeny w konfiguracjach: całe białko, PGRP-SH3_5, CHAP, CHAP-PGRP. Wykazano, że domena PGRP odgrywała rolę w wiązaniu PGNu, a niekoniecznie katalityczną. Nie przebadano jednak pojedynczej domeny PGRP. W badaniach tych wykonano chimeryczne białka z domeną wiążącą peptydoglikan (SH3) pochodzącej z lizostafiny (bakteriocyny produkowanej przez *Staphylococcus simulans*), która degradowuje peptydoglikan *S. aureus*. W przypadku autolizyny LytO takie połączenie nie poskutkowało jednak wzrostem aktywności na tyle dużej, by działało lepiej niż sama lizostafina. Z badań tej grupy wynikało też, że białko LytO ma $T_m \sim 43^\circ\text{C}$, określono też T_m utworzonych konfiguracji białka i wahały się one o kilka stopni od $\sim 40,4^\circ\text{C}$ do $\sim 46^\circ\text{C}$ ⁷⁸.

5.10.1 Analiza bioinformatyczna białka LytO

Po wyciągnięciu wniosków z pracy nad endolizyną K11gp3.5 tym razem zaczęłam od dokładniejszych analiz bioinformatycznych. W przypadku endolizyny K11gp3.5 do poszukiwania homologów strukturalnych wykorzystałam Foldseek. Narzędzie Foldseek jest tak zaprojektowane, by szukać strukturalnych homologów przez zmianę trójwymiarowej struktury w aminokwasową sekwencję strukturalną. Dzięki temu dokonuje porównania w krótkim czasie (kilkanaście sekund do kilku minut), w wielu bazach danych. Natomiast w przypadku białka LytO, O3I, Lyc2 i LytA_27 skorzystałam z DALI (Distance-matrix ALIGNment), narzędzia, które działa wolniej i nieco inaczej niż Foldseek. Narzędzie DALI dokonuje globalnego porównania modelu białka, porównuje odległości w modelach białek pomiędzy atomami, jest dokładniejszy, ale działa dużo wolniej (kilka godzin). W przypadku, kiedy znajduje się dużo dopasowań (szablonów) dla białka, to Foldseek jest wystarczający. Kiedy występują problemy ze znalezieniem strukturalnych homologów należy sięgnąć po inne

narzędzia. Narzędzie Foldseek nie było w stanie znaleźć dobrych i wystarczających szablonów białek, dlatego później korzystałam z DALI.

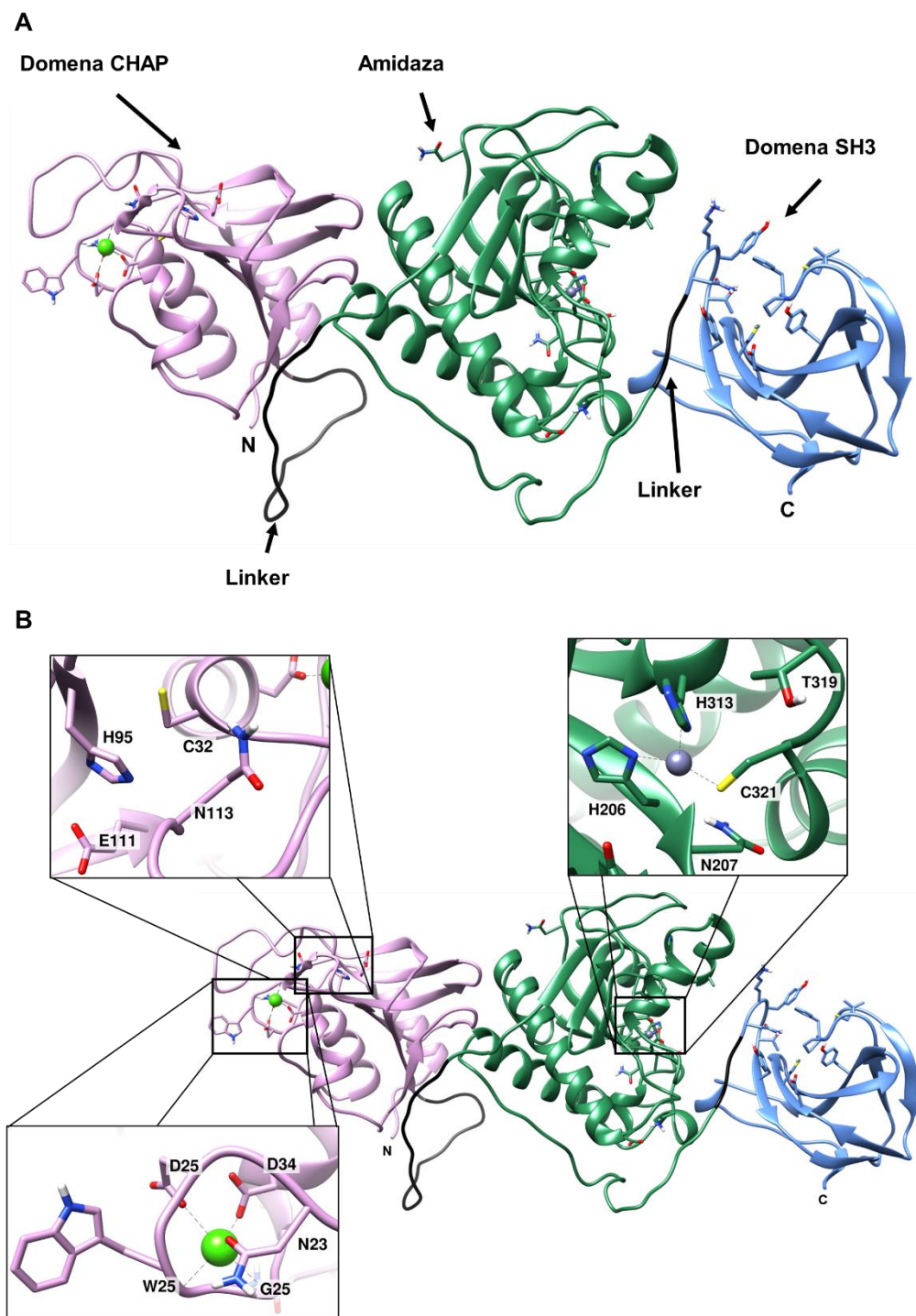
Jak już wiadomo, białko LytO to autolizyna, która składa się z trzech domen (Ryc. 37A). W swojej budowie jest podobna do endolizyny, LysGH15 pochodzącej z bakteriofaga GH15 infekującego *S. aureus*⁶⁸.

Na N-końcu białka znajduje się domena CHAP (Cysteino, histydyno-zależna amidohydrolaza/peptydaza), która przecina wiązanie peptydowe w peptydoglikanie. Miejsce aktywne składa się z motywu CHEN charakterystycznego dla tej domeny. W białku LytO są to kolejno: C32, H95, E111 i N113 (Ryc. 37B). Obok centrum znajduje się miejsce koordynujące Ca^{2+} przez reszty: N23, D25, G29, W27 i D34 (Ryc. 37B).

Kolejna, środkowa domena, to homolog strukturalny endolizyny Ts2631, czyli amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa (Ryc. 37A). Miejsce aktywne składa się reszt: H206, A236, H313, T319 i C321, w którego centrum znajduje się Zn^{2+} koordynowany przez: H206, H313 i C321 (Ryc. 37B). Domena ta także odpowiada za wiązanie z peptydoglikanem. Według danych z GenBanku reszty, które wchodzi w skład rowka wiążącego PGN, to kolejno: N207, D208, A233, A236, L249, W256, H257, N264, H313, T317, T319, S320 i C321.

Z analizy bioinformatycznej wynikało, że za oddziaływanie z substratem mogą też odpowiadać: N280, A281, L284, V366, A367, V369, A375, S377, N378 i T379. Sprawdziłam także, że białko może oddziaływać z Na^{2+} , w co zaangażowane mogą być kolejne reszty: E251, R307, N308, K300, K247, Q355, I364, P365 i V366.

Ostatnia domena znajdująca się na C-końcu białka to domena SH3b, która odpowiada za wiązanie PGNu. Reszty, które są zaangażowane w to wiązanie, to prawdopodobnie: N390, Y392, T394, Y396, V415, G416, P417, F418, C421, E437, M439 i Y457.

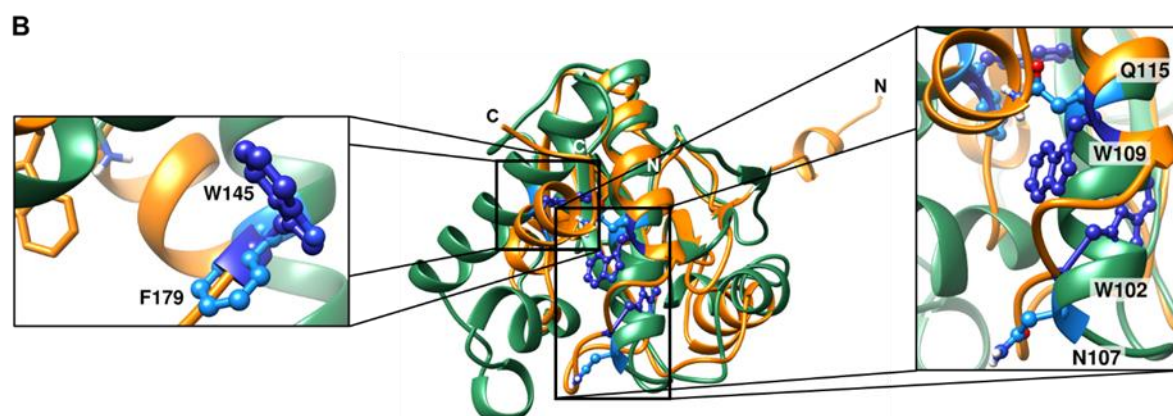


Ryc. 37. Model przestrzenny autolizyny LytO. **A** – Model białka z zaznaczonymi poszczególnymi domenami. Kolorem śliwkowym zaznaczono domenę CHAP, kolorem zielonym domenę N-acetylo-muramylo-L-alaninową, kolorem niebieskim domenę SH3 a na czarno zaznaczone są linkery. **B** – W modelu białka LytO wyróżniono centra katalityczne białek oraz miejsca wiązania jonów niezbędnych do aktywności białka. Kolorem zielonym oznaczono Ca^{2+} a szarym Zn^{2+} .

W następnym kroku porównałam ze sobą sekwencje endolizyny Ts2631 i domeny amidazy białka LytO. Pokrycie sekwencji samej domeny amidazowej LytO i endolizyny Ts2631 wynosi zaledwie 8% (według NCBI BLASTp). Aminokwasom W102, W109, P140 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 odpowiadały kolejno: N280, Q288, P322 i F352 w białku LytO. Biorąc pod uwagę pojedynczą domenę amidazy, to aa te stanowiły kolejno: N107, Q115, P149 i F179 (Ryc. 38). Po uwzględnieniu analiz bioinformatycznych, gdzie wykazałam, że reszta N280 może być istotna w wiązaniu z substratem i jej substytucja mogłaby skutkować brakiem, albo obniżeniem aktywności białka, wstępnie postanowiłam utworzyć wariant LytO_Q288W_F352W.

Wykonałam jeszcze predykcję wpływu mutacji na stabilność białka za pomocą metod wypisanych w podrozdziale 3.11.2. Większość z nich wykazała, że doprowadzą one do destabilizacji białka (Tab. S1). Uzyskany wynik potraktowałam jako wskazówkę i mimo, że większość programów wskazała, że zmiany te będą niekorzystne podjęłam się próby przebadania wariantów substytucyjnych. Jednak ze względu na te wyniki oraz obawę, że w przypadku całego białka zmiana dwóch aminokwasów w całym białku mogłaby skutkować niewielkim wzrostem T_m , postanowiłam wykonać wariant, który składałby się tylko z pojedynczej domeny amidazy białka LytO. Firmie BioCat zleciłam wykonanie konstruktów: domeny amidazy białka LytO oraz wariantu Q115W_F179W.

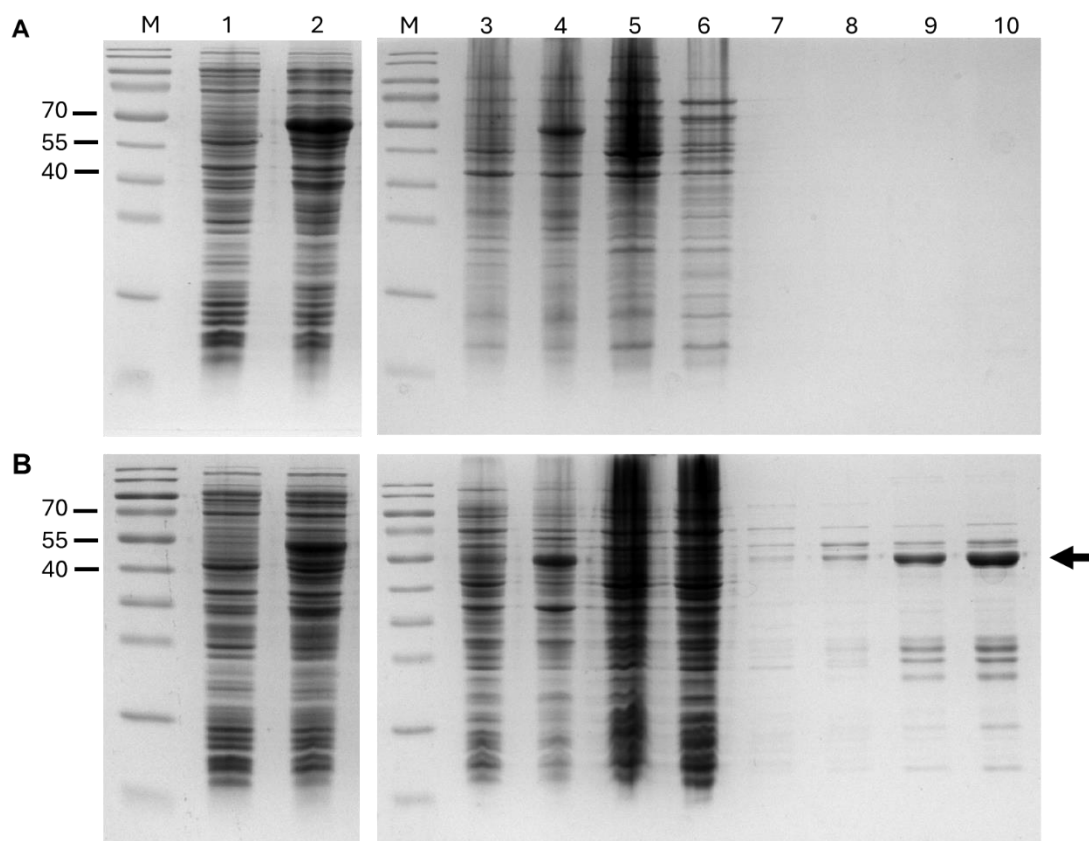
A	Ts2631	1MRIL	EFWNRWYRQK	RA.YFVRLTP	IHYVVLHHTA	33	
	LytO-amidaza	1	QPKAVELKII	KDVVVG.....YDLPKRGSN	PKGIVIHND	35	
	Ts2631	34	GPENQ...TP	.EAIK..R..	.YHE.EARGW	..PHIGYHYL	VYRDGRVYKT	71
	LytO-amidaza	36	GSKGATAEAY	RNG.IVNAPL	S..RL....E	AG...IAHSY	VS.GNIVWQA	74
	Ts2631	72	LENNVPICV	.REF.NFVSI	CVAAVGD...	.FSAGVWP..	.DDAPG.WFA	111
	LytO-amidaza	75	IDESCQGWHT	ANQIGNKYYY	GIEVCQSMGA	D.....NATF	L..K.NEQ.A	115
	Ts2631	112	LWELKQALAK	AY.P....K	ALFVLHKNIV	PTECPGRL..	143
	LytO-amidaza	116	TFQECARILK	KWGLFANFN.	.TIRLNEFT	STSCPHRSSV	LHTGFDFVTR	163
	Ts2631	143T...WE	.LIQ.....R	KGG.GGQ	156		
	LytO-amidaza	164	GLLPEDKRLQ	LKDYFIK..Q	IFAYMDGKI.	..FV... 192		



Ryc. 38. Porównanie sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 i domeny amidazy białka LytO. A – Szare prostokąty wskazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacięniowania: 100%). Czerwonymi prostokątami oznaczono reszty, które są istotne w stabilności termicznej endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji domenie amidazy białka LytO. **B** – Nałożone na siebie struktura endolizyny Ts2631 (na pomarańczowo) oraz domeny amidazy autolizyny LytO (na zielono). Na powiększeniu zaznaczono aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz N107, Q115 i F179 w sekwencji domeny amidazy LytO.

5.10.2 Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka LytO

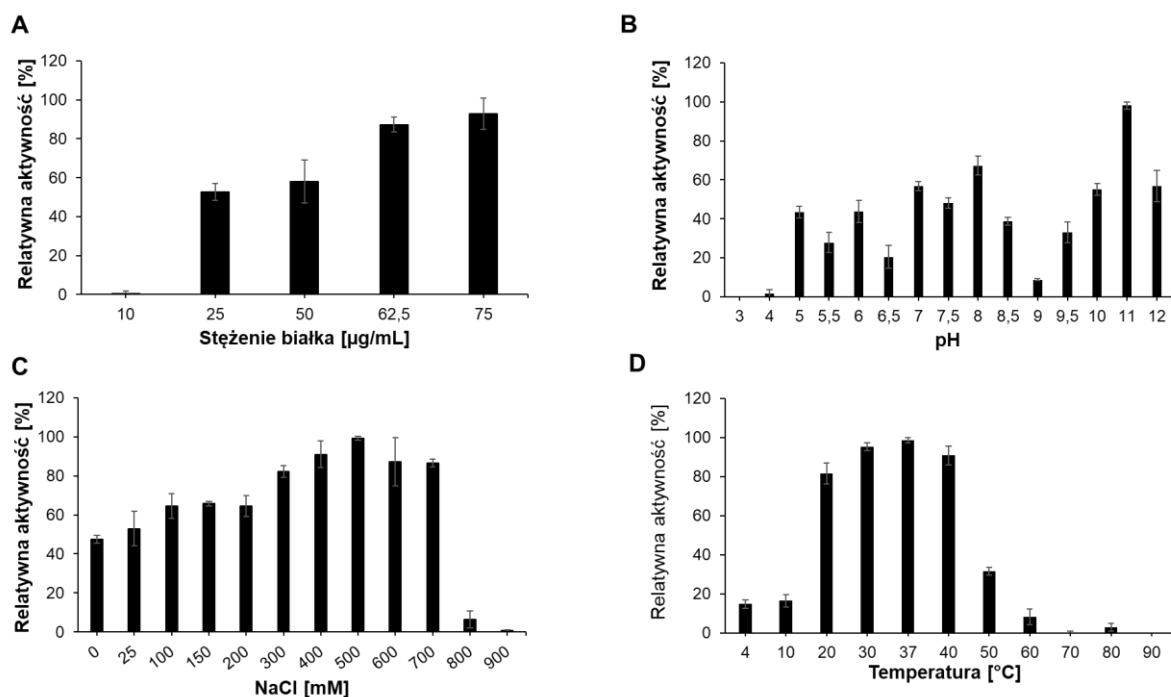
Najpierw przebadalam całe białko LytO. Po otrzymaniu konstrukt w plazmidzie pET-15b, w którym znajdował się gen, którego produktem było białko LytO przystąpiłam do transformacji chemicznej komórek *E. coli* BL21(DE3) o raz *E. coli* DH5α. Następnie przesłam do nadprodukcji zgodnie z warunkami określonymi w publikacji autorów, którzy jako pierwsi zajęli się tą autolizyną⁷⁸. Hodowlę bakteryjną indukowałam 1 mM IPTG przy OD₆₀₀ ~0,4 a następnie przeniosłam ją do 25°C, gdzie wytrząsała się przez noc. Nadprodukcja białka przebiegła zgodnie z oczekiwaniami, jednak nie udało się go oczyścić (Ryc. 39A). W związku z brakiem produktu białkowego po oczyszczaniu przystąpiłam do sprawdzonej wcześniej procedury (przy nadprodukcji endolizyny K11gp3.5) i obniżyłam temperaturę nadprodukcji z 25°C do 18°C, co poskutkowało wydajnym oczyszczeniem białka (Ryc. 39B).



Ryc. 39. Nadprodukcja i oczyszczanie autolizyny LytO. Nadprodukcja rekombinowanego białka LytO w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 16 godzin **A** – w 25° i w **B** – 18°C oraz oczyszczanie ich metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12,5%). Strzałką wskazany jest prążek odpowiadający masie molekularnej białka.

5.10.3 Testy aktywności autolizyny LytO

Autolizyna LytO pochodzi z bakterii *S. aureus* subsp. *aureus* NCTC 8325. Wobec tego, że autolizyny są specyficzne co do gatunku, posiadając w kolekcji KPD KM inne szczepy *S. aureus* zdecydowałam się najpierw przetestować aktywność lityczną białka w różnych stężeniach na jednym ze szczepów, *S. aureus* KPD 425 (MRSA). W tym celu przeprowadziłam TRZ, gdzie po 30 minutach zaobserwowałam, że białko LytO działa najlepiej w stężeniu 75 µg/mL, jednak już w 62,5 µg/mL dochodziło do lizy substratu *S. aureus* na podobnym poziomie (Ryc. 40A), dlatego stężenie 62,5 µg/mL wykorzystałam do dalszych etapów badań.



Ryc. 40. Analiza aktywności białka LytO w różnych warunkach. Wszystkie testy były prowadzone przez 30 minut w 37°C, przy zastosowaniu białka o stężeniu 62,5 µg/mL. Substrat jaki zastosowano to: *S. aureus* KPD 425 (MRSA). **A** – testowanie różnych stężenie białka; **B** – test aktywności w zależności od pH buforu; **C** – test aktywności w zależności od stężenia NaCl w 10 mM buforze fosforanowo-potasowym (Kpi), pH 8,0; **D** – test aktywności w buforze Kpi, pH 8,0 z 500 mM NaCl.

Następnie sprawdziłam zakres pH, w jakim białko jest aktywne litycznie. Wykazałam, że białko obejmuje szerokie spektrum aktywności zaczynając od pH 5,0 do 8,5 oraz w 9,5 do 12,0. Najefektywniej białko działa w pH 11,0, a zaraz potem w pH 8,0, ale już na poziomie 67,27% w porównaniu do pH 11,0 (Ryc. 40B). W laboratorium standardowo wykorzystywałam bufor KPi o pH 8,0 a skoro białko wykazywało w nim aktywność to dalsze eksperymenty planowałam z wykorzystaniem właśnie tego buforu. W kolejnym kroku sprawdziłam aktywność białka w zależności od siły jonowej buforu. Tu z kolei autolizyna LytO wykazała aktywność na poziomie 86,71% aż do 700 mM NaCl. Drastyczny spadek (6,39%) zaobserwowałam przy badaniu aktywności białka w 800 mM NaCl. Białko najefektywniej działało w 500 mM NaCl, dlatego to stężenie soli wybrałam do dalszych eksperymentów (Ryc. 40C). Tolerancja na wysokie stężenie soli może wynikać z faktu, że białko pochodzi z *S. aureus*, bakterii która funkcjonuje w środowisku o wysokim zasoleniu (10-15%). Z tego względu autolizyny pochodzące z tych bakterii mogą być ewolucyjnie przystosowane do działania w warunkach wysokiego stężenia soli, jakie występuje w otoczeniu ściany komórkowej bakterii. W badaniach nad aktywnością autolizyn ze *S. aureus*, np. Atl pokazuje się, że aby aktywować autolizynę potrzebne jest wysokie stężenie NaCl, nawet 1 M, podczas gdy w stężeniu 200 mM, autolizyna

prawie nie wykazuje aktywności¹⁸⁸. Nie jest to jednak mechanizm zależny tylko od soli, ale także od temperatury, czy Ca^{2+} ^{188,189}.

Z kolei badając optimum temperatury dla aktywności białka wykazałam, że w temperaturze 37°C, białko najefektywniej prowadzi do lizy komórek bakteryjnych, podczas gdy już w 50°C obserwowałam spadek aktywności do 31,57%.

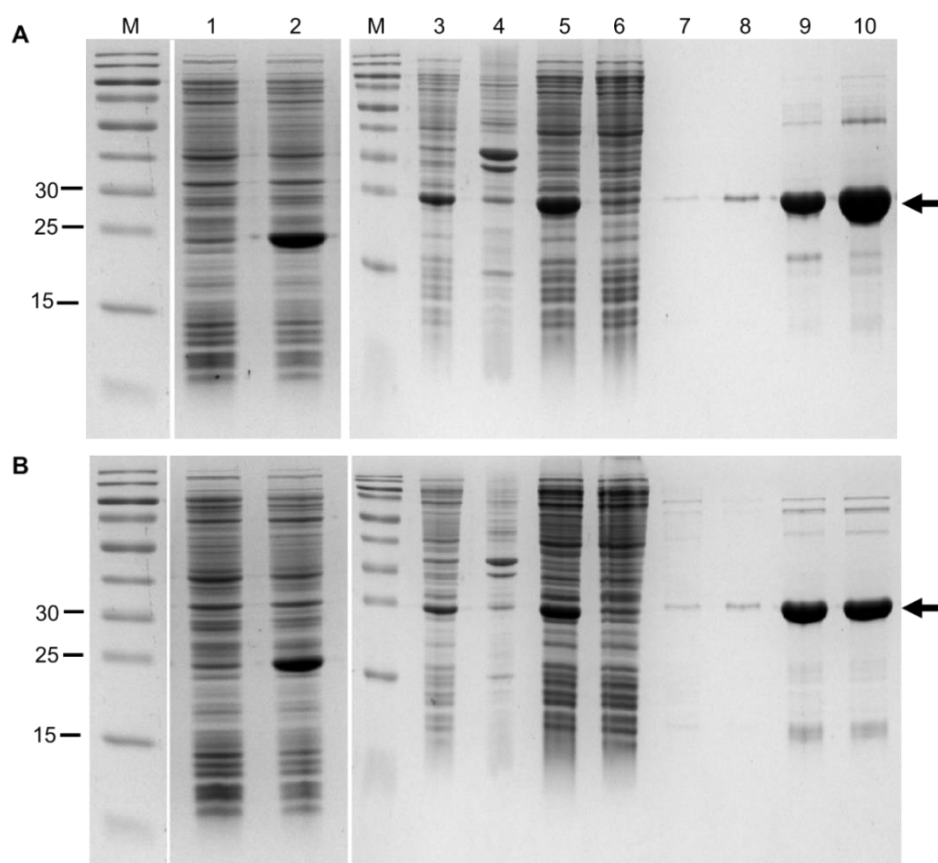
Autolizyny są specyficzne co do gatunku bakterii, jednak mimo to postanowiłam sprawdzić specyficzność substratową autolizyny LytO, którą zaprezentowałam w Tab. 8. Autolizyna ta wykazała aktywność względem jednego z dwóch testowanych szczepów *S. aureus*, natomiast zaobserwowałam także aktywność na poziomie 29,20% i 11,88% kolejno w stosunku do *B. subtilis* i *L. monocytogenes*, które są bakteriami Gram-dodatnimi. Przyczyną tej niewielkiej aktywności litycznej, ale jednak występującej, mogą być różnice w budowie ściany bakterii. W przypadku szczepów gronkowcowych jedną z możliwych przyczyn jest O-acetylacja kwasu muraminowego, przez co enzym nie będzie oddziaływał z substratem¹⁹⁰. Dwie pozostałe bakterie różnią się typem PGNu. U *S. aureus* występuje typ A3 α , natomiast u *B. subtilis* i *L. monocytogenes* typ A1 γ ¹⁹¹. W obu przypadkach to wiązanie domeny SH3-5 (która rozpoznaje specyficzne motywy) może być ograniczone, albo nie występować w ogóle, podczas gdy domeny CHAP/ amidaza mogą częściowo wiązać się z substratem i go degradować.

Tab. 8. Specyficzność substratowa autolizyny LytO. Relatywna aktywność jest wyrażona jako procent aktywności w stosunku do *Staphylococcus aureus* MRSA KPD 425. SD – odchylenie standardowe z 3 powtórzeń.

	Szczep bakteryjny	Relatywna aktywność lityczna [%] \pm SD
Bakterie Gram-ujemne	<i>Escherichia coli</i> MG1655	3,02 \pm 3,64
	<i>Salmonella enterica</i> Serowar Panama	0
	<i>Citribacter braakii</i> sp.	0
	<i>Acinetobacter baumannii</i> KPD 735	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 430	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPD 298	0,00 \pm 1,52
Bakterie Gram-dodatnie	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA KPD 425	98,91 \pm 1,86
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC 25923	0
	<i>Bacillus megaterium</i> ATTC 14581	0

5.10.4 Analiza pojedynczej domeny amidazy oraz jej wariantu

Po otrzymaniu konstruktów plazmidowych z firmy BioCat przeprowadziłam transformację chemiczną po czym przystąpiłam do nadprodukcji i oczyszczania pojedynczej domeny amidazy białka LytO oraz jego wariantu LytO_Q115W_F179W. Nadprodukcję i oczyszczanie prowadziłam tak, jak w przypadku kompletnego białka LytO, co zakończyło się powodzeniem (Ryc. 41).



Ryc. 41. Nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazy autolizyny LytO oraz jej wariantu. Nadprodukcja rekombinowanych białek w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. **A** – nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazowej białka typu dzikiego; **B** – nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazowej wariantu

Q115W_F179W. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Strzałką wskazany jest prążek odpowiadający masie molekularnej białka.

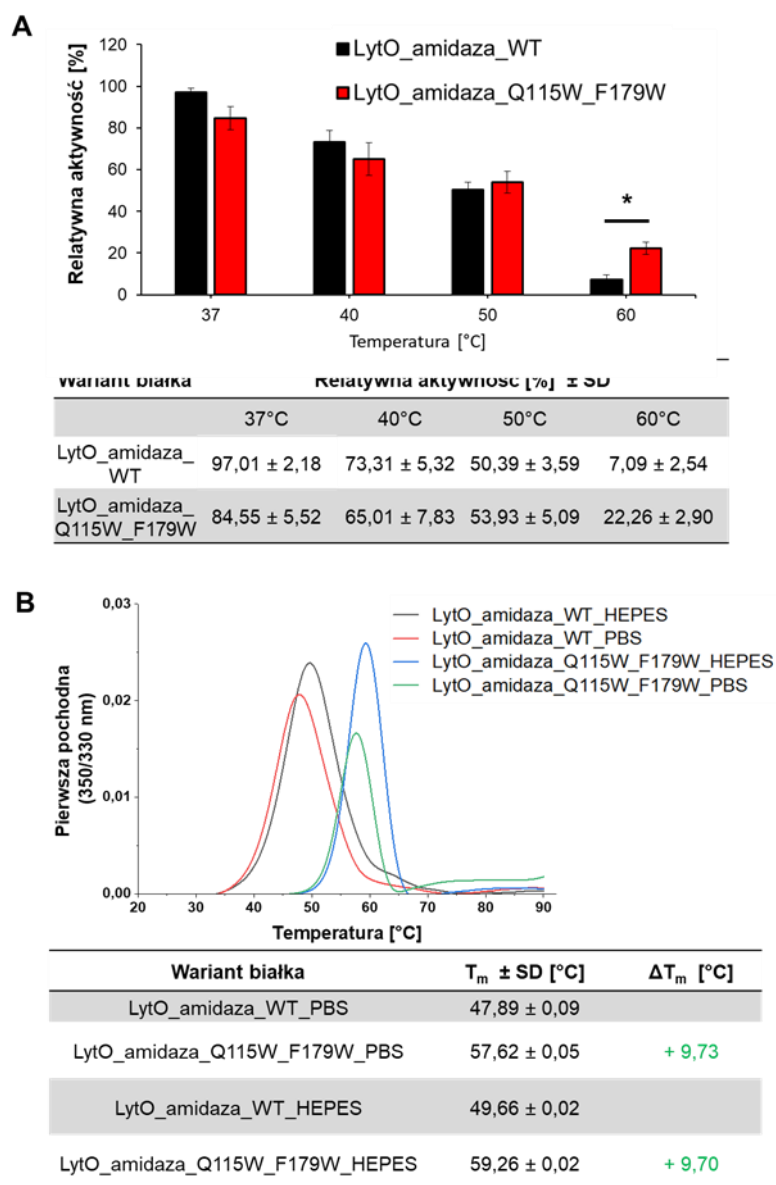
5.10.5 Testy aktywności domeny amidazy białka LytO o raz jej wariantu Q115W_F179W

Następnym krokiem było sprawdzenie aktywności pojedynczej domeny białka. Po wykonaniu TRZ w buforze składającym się z Kpi, pH 8,0 i 500 mM NaCl nie zaobserwowałam jej aktywności. Dlatego test przeprowadziłam jeszcze w buforze PBS, pH 7,4 i Kpi pH 8,0 bez dodatku soli. Wykazałam, że białko najefektywniej doprowadza do degradacji komórek bakteryjnych *S. aureus* w buforze Kpi pH 8,0, przy czym wydłużyłam czas działania z 30 minut do 1 godziny i zastosowałam dwukrotnie wyższe stężenie, bo 125 µg/mL, niż w przypadku całego białka LytO. Pozbawiając białko domeny katalitycznej CHAP, która jest najbardziej istotna w aktywności litycznej białka, prawdopodobnie znacznie zredukowałam aktywność lityczną białka⁶⁸.

Następnie porównałam aktywność domen amidazy białka LytO typu dzikiego oraz wariantu Q115W_F179W, wykonując TRZ w 37°C, gdzie substratem był *S. aureus* KPD 425. Doświadczenie prowadziłam przez 1 godzinę, a stężenie każdego z wariantów jakie zastosowałam, to 125 µg/mL. Wariant substytucyjny wykazał aktywność na poziomie 84,55% w porównaniu do białka typu dzikiego, który stanowił 100% aktywności (Ryc. 42A). Uznałam, że wyniki te nie odbiegają znacząco od siebie i przeprowadziłam kolejne testy, w których najpierw inkubowałam białko przez 15 minut, w 40°C, 50°C i 60°C a następnie prowadziłam TRZ w warunkach podanych wyżej. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów pokazałam, że wraz ze wzrostem temperatury, w której białka były wstępnie inkubowane, ich aktywność spada. Widać natomiast, że trend spadkowy w przypadku wariantu Q115W_F179 jest wolniejszy i już w 50°C jego aktywność jest wyższa o 3,54% w stosunku do białka typu dzikiego. Natomiast w 60°C choć aktywność wariantu substytucyjnego jest znikoma i wynosi 22,26%, to jest wyższa od wariantu typu dzikiego w tej samej temperaturze o 15,17%, co stanowi istotną statystycznie różnicę (Ryc. 42A).

Przeprowadziłam także analizę nanoDSF, gdzie białko zawiesiłam w dwóch różnych buforach: A (20 mM HEPES, 25 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,4) oraz B (PBS, pH 7,4), tak jak podczas eksperymentów z endolizyną K11gp3.5 oraz jej wariantu. W przypadku obu buforów porównując ze sobą tylko dany wariant między buforami, T_m różni się o niecałe 2°C i to w buforze A ta wartość jest wyższa. Widać tutaj odwrotny efekt niż w przypadku endolizyny K11gp3.5, gdzie w buforze B T_m była wyższa. Można to wyjaśnić tym, że w domenie amidazy

białka LytO na powierzchni białka występują 22 dodatnio naładowane reszty, a jego pI wynosi 9,32 (u K11gp3.5 jest to 8,48, punkty izoelektryczne wyznaczyłam teoretycznie za pomocą narzędzia ProtParam, <https://web.expasy.org/protparam/>). Można przypuszczać, że tutaj jony fosforanowe pochodzące z PBS zaburzą hydratację powierzchniową i destabilizują konformację w przeciwieństwie do buforu HEPES, który z białkami oddziałuje dużo słabiej.



Ryc. 42. Test aktywności oraz analiza nanoDSF domeny amidazy białka LytO oraz wariantu Q115W_F179W. A – Test redukcji zmętnienia (TRZ) przeprowadzono z wykorzystaniem białka o stężeniu 125 μg/mL, w buforze 10 mM Kpi, pH 8,0 przeciw *S. aureus* KPD 425. Test prowadzono w temperaturze 37°C, a białko w 40, 50 i 60°C było wstępnie inkubowane przez 15 minut, po czym poddane TRZ. Czarny słupek wskazuje na wynik TRZ białka typu dzikiego a czerwony wskazuje na wariant. Do analizy statystycznej wykorzystano test *t* Studenta, gdzie $p \leq 0,01$ *. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki są przedstawione w postaci relatywnej aktywności, gdzie 100% stanowił spadek gęstości optycznej białka typu

dzikiego w 37°C. **B** – wynik pomiaru temperatury topnienia obu białek. Wykres wskazuje na jakościowy pomiar a w tabeli zestawione są wyniki pomiaru T_m w dwóch różnych buforach.

Bufor fosforanowo-sodowy wpływa na stabilność białek, ale może je także destabilizować. W badaniach nad wpływem buforu fosforanowego w różnych stężeniach wykazano, że poprawia on stabilność termiczną białek: lizozymu, bromelainy i albuminy surowicy ludzkiej, natomiast w przypadku białka hemoglobiny ta stabilność została obniżona. Obserwuje się, że wpływ buforu na białko zależy od rodzaju białka¹⁹².

Przyglądając się różnicy w wartości T_m wariantu typu dzikiego oraz Q115W_F179W można zaobserwować, że w obu buforach widoczna jest podobna różnica w zmianie T_m na korzyść wariantu Q115W_F179W, gdzie jest ona wyższa o 9,7°C od białka typu dzikiego (Ryc. 42B). W wariacie zamieniłam 2 aa: glutaminę (Q) oraz fenyloalaninę (F), które znajdowały się pośrodku dwóch przeciwległych α -helis, na tryptofan (W). Glutamina jest aminokwasem, który w białkach termostabilnych występuje rzadziej niż u mezofili. Jest uważamy za niekorzystny, ponieważ w miarę wzrostu temperatury, następuje deamidacja (powstaje kwas glutaminowy), co w konsekwencji może wpłynąć na interakcje między innymi aminokwasami wpływając na fałdowanie białka, czy jego aktywność⁹⁷. Zastąpienie tego polarnego aminokwasu na hydrofobowy tryptofan mogło lokalnie wpłynąć na poprawę stabilności, a także konformacji białka. Z kolei zamiana fenyloalaniny na tryptofan to zwiększenie powierzchni do oddziaływań, dzięki dużemu pierścieniowi indolowemu tryptofanu¹⁵¹. Przyglądając się bliżej strukturze białka można zauważyć, że mogły powstać nowe interhelikalne oddziaływania aromatyczne między W179 a F117 oraz W115 i Y178. Oddziaływania aromatyczne, jakie mogły się dodatkowo pojawić prawdopodobnie ustabilizowały α -helisy, co skutkowało wzrostem T_m ^{193,194}.

5.11 Pozostałe białka

W przypadku białek: O3I_029140 (w skrócie O3I), Lyt_A27 oraz Lyc2 przeprowadziłam tylko niektóre analizy ze względu na problemy podczas oczyszczania białek bądź ich wariantów substytucyjnych.

5.11.1 O3I_029140

Białko O3I nie ma poznanej funkcji, jego masa molekularna wynosi 42,94 kDa, teoretyczny pI to 4,86 i ma długość 390 aa. Pochodzi z bakterii *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358/HUJEG-1. Bakteria, z której pochodzi białko to Gram-dodatni aerob, wywołujący nocardiozę

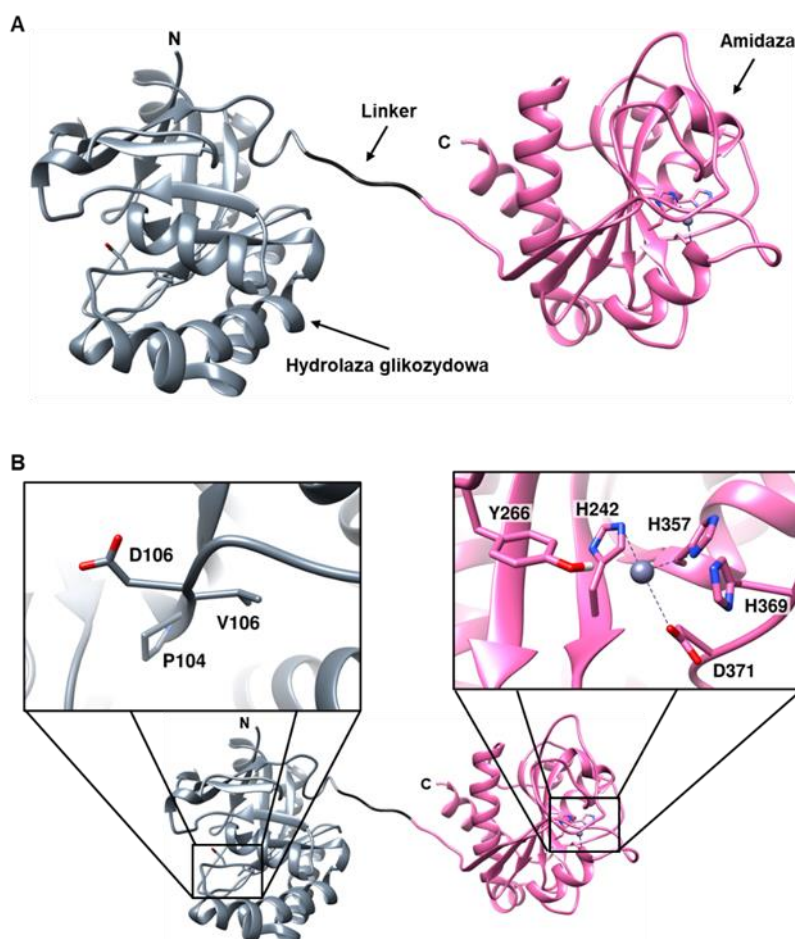
głównie u osób z upośledzoną odpornością. Głównymi miejscami infekcji są płuca, mózg i skóra. Choroba ta jednak występuje rzadko (500 – 1000 przypadków rocznie)¹⁹⁵.

W przypadku białka O3I przeprowadziłam jedynie analizę bioinformatyczną, ponieważ próby oczyszczania zakończyły się niepowodzeniem. W materiałach dodatkowych zamieściłam rycinę przedstawiającą żełe poliakrylamidowe po elektroforezie SDS-PAGE z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania. W opisach rycin zamieszone są informacje o warunkach w jakich oczyszczałam białko (Ryc. S5).

Białko O3I ma długość 390 aa i składa się z dwóch domen połączonych ze sobą linkerem (Ryc. 43A). Na N-końcu białka znajduje się prawdopodobnie hydrolaza glikozydowa z rodziny GH25. Tnie ona wiązanie β -1,4-glikozydowe pomiędzy N-acetyloglukozaminą a kwasem N-acetylmuraminowym. Hydrolaza z rodziny GH25 składa się z charakterystycznego układu podobnego do TIM-beczki (TIM-barrel). Zbudowana jest z 8 β -nici otoczonych przez 6 α -helis, co nieco odbiega od kanonicznego modelu, w którym znajduje się 8 α -helis. Ostatnia, ósma nić jest antyrównoległa do pozostałych β -nici. W innych modelach hydrolaz glikozydowych występuje podobny układ, np. w białku Rv252c (PDB: 4PMQ¹⁹⁶), które pochodzi z *Mycobacterium tuberculosis*, czy domena katalityczna endolizyny faga vB_phiSM101 infekującego *Clostridium perfringens* (PDB: 4KRU¹⁹⁷). Glikozydazy GH25 charakteryzują się niską homologią sekwencji. Porównując sekwencję aminokwasową O3I, to jej podobieństwo do białka Rv2525c jest dość wysokie, bo wynosi 48% (według DALI), a do endolizyny faga vB_phiSM101 jest to już zaledwie 14%. Większość glikozydaz GH25 posiada miejsce katalityczne, które znajduje się na C-końcu piątej β -nici. W domenie GH25 białka O3I w skład tego miejsca wchodzi P104, V105 i D106. Jest to nieco inny motyw niż ten, który standardowo występuje u glikozydaz GH25 (DXE). Niejednokrotnie już wykazano, że w rodzinie tej nie występuje uniwersalny motyw miejsca katalitycznego. W przypadku wymienionego białka Rv2525c miejsce katalityczne składa się z reszt: S142, I143, D144¹⁹⁶. Z kolei w wiązanie PGNu mogą być zaangażowane takie reszty, jak: D106, Y137, H158 i W160.

Na C-końcu białka O3I znajduje się N-acetylmuramylo-L-alaninowa amidaza z jonem Zn^{2+} w centrum katalitycznym, która jest strukturalnym homologiem endolizyny Ts2631. Zn^{2+} koordynowany jest przez reszty: H242, H357 i D371. W bazie danych PDB domena ta wykazała podobieństwo sekwencji aa w 19% do hydrolazy AmiA (PDB: 4KNL) z *S. aureus*¹⁹⁸, w 17% do hydrolazy AmiE (PDB: 3LAT) z *S. epidermidis*¹⁹⁹ i w 18% do hydrolazy PlyL (PDB: 1YB0) z endolizyny profaga z *Bacillus anthracis*²⁰⁰. Wymienione białka

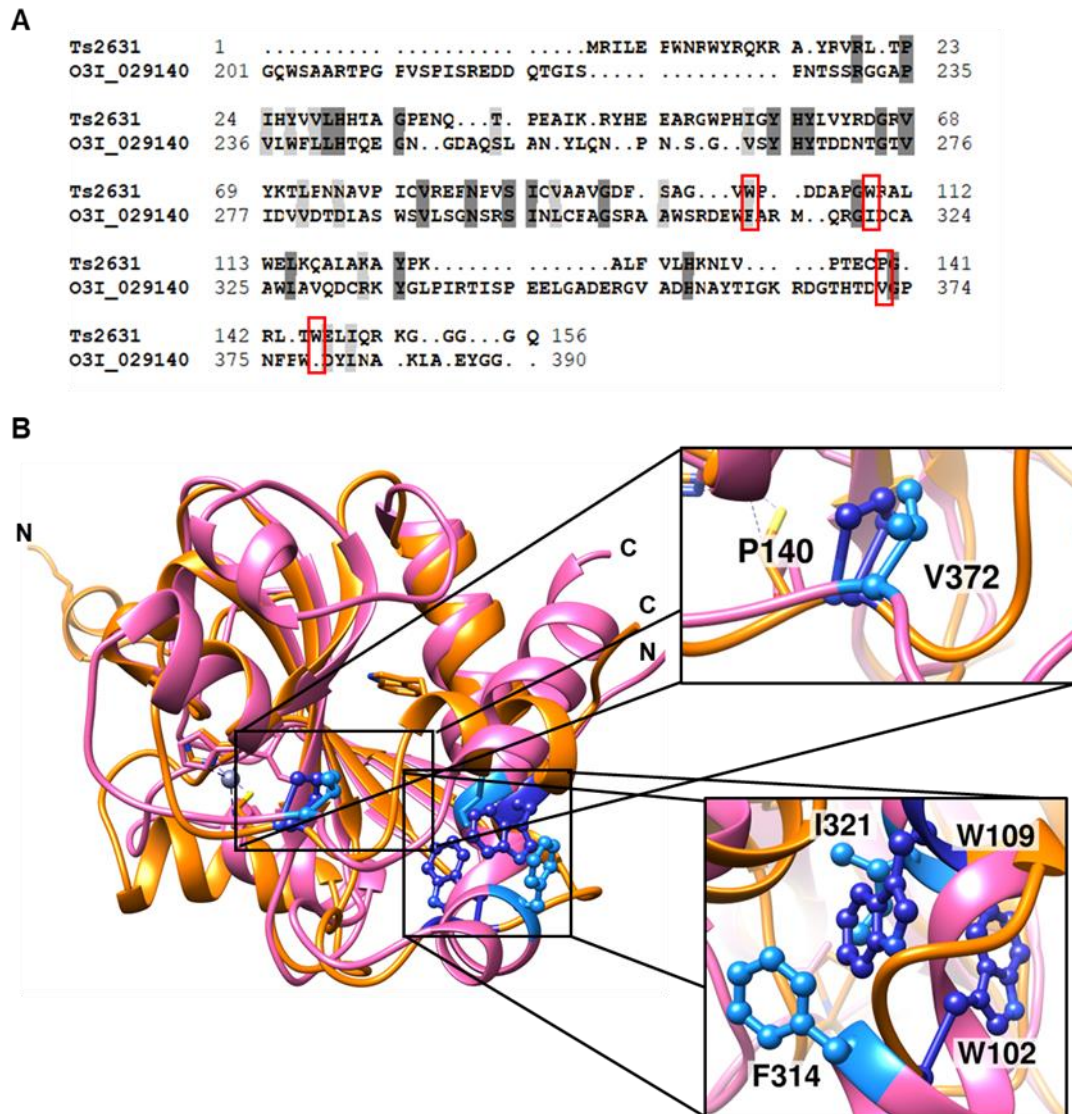
wykorzystałam do bardziej dokładnej analizy domeny amidazowej białka. Na tej podstawie dalszej analizy bioinformatycznej zaobserwowałam, że w wiązanie peptydoglikanu zaangażowane mogą być reszty: H242, T243, Q245, E246, L253, G263, V264, Y266, W287, S288, V289, L290, S291, N293, C300, H357, T368, H369 i D371. Ta domena prawdopodobnie może też oddziaływać z sodem, gdzie z kolei reszty: T282, K334, R340, S343, E346, I342 mogą być potencjalnie w to wiązanie zaangażowane.



Ryc. 43. Model przestrzenny białka O3I_029140. **A** – Model białka z zaznaczonymi poszczególnymi domenami. Na szaro zaznaczona jest hydrolaza glikozydowa, a ciemno-pomarańczowo domena N-acetylo-muramylo-L-alaninowa, które połączone są ze sobą czarnym linkerem. **B** – W modelu białka zaznaczone i powiększone są centra aktywne obu domen. W domenie amidazy zostały zaznaczone reszty koordynujące Zn^{2+} (szara kula).

Po przeanalizowaniu struktury białka przeszłam do porównania sekwencji aa nałożonych na siebie: struktury przestrzennej endolizyny Ts2631 oraz modelu białka O3I (Ryc. 44A). Porównanie sekwencji domeny amidazowej O3I i białka Ts2631 nie wykazało istotnych podobieństw (NCBI BLASTp). W białku O3I przyjrzałam się aminokwasom, biorącym udział w utrzymaniu stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Aminokwasom W102, W109 i P140

odpowiadały kolejno: F314, I321 i V372. Reszcie W145 nie odpowiadał żaden aminokwas. Żadna z wymienionych reszt według przeprowadzonej analizy bioinformatycznej nie jest konserwowana i nie pełni istotnej funkcji w białku.



Ryc. 44. Porównanie sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 z O3I_029140. A – Prostokąty w szarym odcieniu pokazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacieniowania: 100%). Czerwonymi prostokątami oznaczono reszty, które są istotne w stabilności termicznej endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji domenie amidazy białka O3I_029140. **B –** Na rycinie pokazany jest model domeny amidazy białka O3I_029140 nałożony na strukturę endolizyny Ts2631 (jasny pomarańczowy). Na powiększeniu zaznaczone są aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz F314, I321, V372 w sekwencji białka pochodzenia mezofilnego.

Przeprowadziłam jeszcze analizę predykcji mutacji na stabilność białka, w której wszystkie programy zgodnie pokazały, że warianty F314W i I321W mogłyby destabilizować białko. Jedynie w przypadku wariantu V372P program DDGun pokazał efekt stabilizujący. Gdybym

jednak miała wykonać wariant białka O3I, to nie zdecydowałabym się na wykonanie substytucji waliny na prolinę, ponieważ znajdując się tak blisko miejsca aktywnego mogłoby to doprowadzić do zaburzenia dynamiki konformacyjnej w tym miejscu i inaktywacji białka.

5.11.2 LytA_27

Białko LytA_27 to prawdopodobna autolizyna o masie 61,94 kDa, teoretycznym pI 4,97 i długości 535 aa. Pochodzi z bakterii *C. beijerinckii* DSM 791. Bakteria, z której pochodzi białko jest Gram-dodatnim anaerobem. Bakteria ta jest brana pod uwagę do zastosowań przemysłowych, m. in. ze względu na jego produkcję 1,3-propanodiolu (ważny składnik do produkcji polimerów, np. poliestru), który powstaje, gdy źródłem węgla jest glicerol²⁰¹.

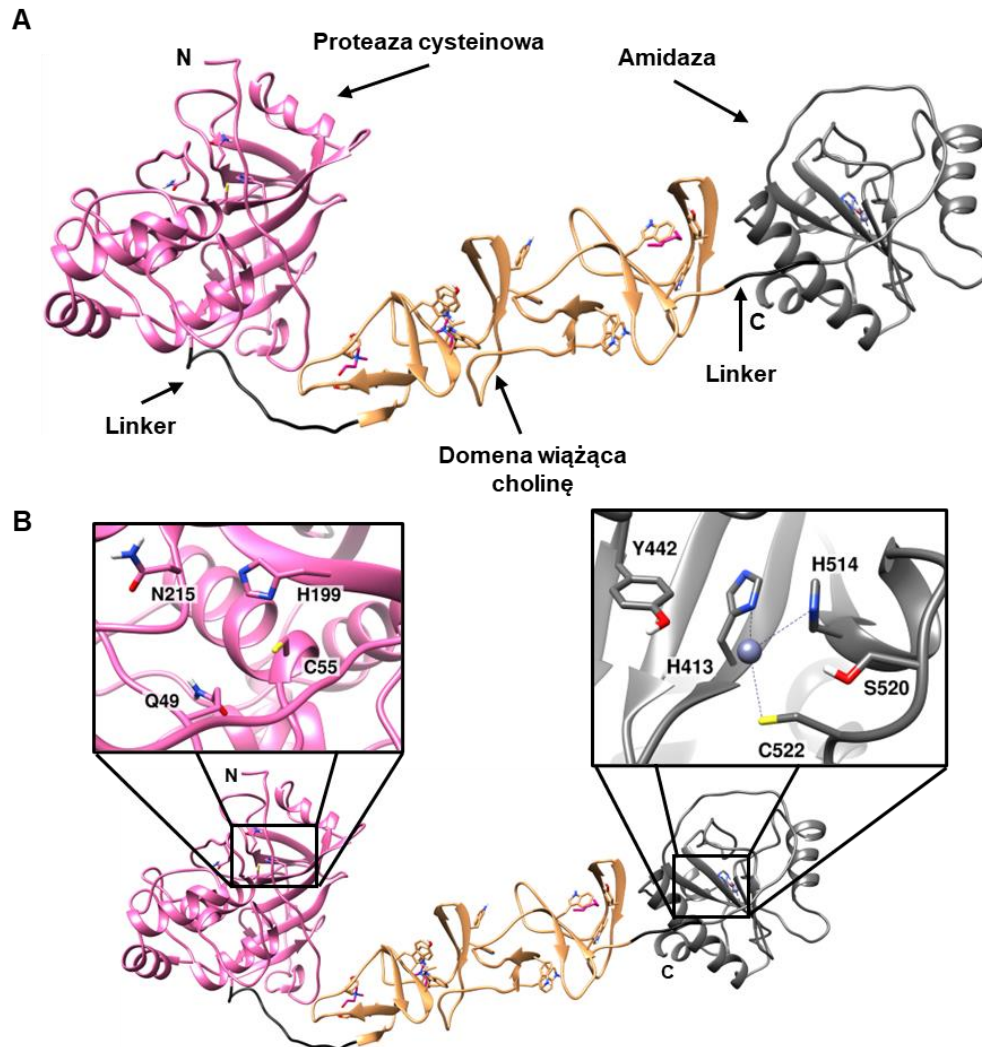
5.11.2.1 Analiza bioinformatyczna

Białko LytA_27 zbudowane jest z 3 domen (Ryc. 45). Na N-końcu białka znajduje się peptydaza cysteinowa, która odpowiada za cięcie wiązań peptydowych w białkach²⁰². W skład centrum katalicznego tej domeny wchodzi: Q49, C55, H199 i N215. Strukturalnymi homologami do których peptydaza cysteinowa LytA_27 jest podobna są: ksylelaina z *Xylella fastidiosa* (PDB: 3OIS)²⁰³, do której wykazuje podobieństwo sekwencji aa na poziomie 24% oraz do katepsyno podobnej peptydazy z *Schistosoma mansoni* (PDB: 4I04)²⁰⁴, gdzie podobieństwo sekwencji aa wynosi 17%. Tego typu domeny często występują w formie zymogenu i posiadają region peptydu, który znajduje się na N-końcu białka zakrywający miejsce kataliczne. Dopiero po zmianie warunków na redukujące dochodzi do aktywacji enzymu.

Centralną domeną białka LytA_27 jest domena wiążąca cholinę. Strukturalnym homologiem tej domeny jest domena wiążąca cholinę pochodząca z profaga LytA *Streptococcus pneumoniae* (PDB 4IWT)²⁰⁵. Cholina może być połączona z kwasami tejchojowymi i lipotejchojowymi, a występuje u niektórych gatunków bakterii, m. in. u *C. beijerinckii*, *Streptococcus mitis*, czy *S. pneumoniae*. Domena wiążąca cholinę wchodzi w interakcję także z innymi aminami IV-rzędowymi, np. dietyloaminoetanolem. Kanoniczne miejsce wiązania choliny powstaje z dwóch hydrofobowych warstw. Tworzą je reszty aromatyczne oraz hydrofobowe (metionina i leucyna)⁶¹.

Po porównaniu sekwencji aa obu białek (LytA i LytA_27) okazało się że wynosi ono 31%. W domenie prawdopodobnej autolizyny LytA_27 znajduje się 6 potencjalnych miejsc (kieszeni) odpowiadających za wiązanie choliny. Reszty prawdopodobnie zaangażowane w te

wiązania, to kolejno: W268, S270, Y276 (jedna kieszeń), W281, W288, M319 (druga kieszeń), I28, Y290, A297, D299 (trzecia kieszeń), W302, W309, M340 (czwarta kieszeń), W324, W331, Y353, C362 (piąta kieszeń), W344, Q346, W352, Y375 (szósta kieszeń). W białku LytA, do którego LytA_27 jest najbardziej podobne, brakowało kanonicznego motywu wiązania choliny, dlatego nie wiadomo, czy może występować u LytA_27²⁰⁵ (reszty, które mogłyby być w to wiązanie zaangażowane to: W260 i W267).



Ryc. 45. Model przestrzenny białka LytA_27. **A** – na rycinie zaznaczone są domeny białka: Proteaza cysteinowa na różowo i N-końcu białka, domena wiążąca cholinę na beżowo występuje na środku, a amidaza znajduje się na C-końcu pokolorowana na pomarańczowo. Domeny połączone są ze sobą linkerami oznaczonymi czarnym kolorem. **B** – zbliżenie na miejsca aktywne występujące w dwóch domenach katalitycznych LytA_27. W proteazie cysteinowej są to: Q49, C55, H199 i N215 (po lewej) a w amidazie zaznaczone są reszty koordynujące Zn^{2+} (H413, H514, C522, po prawej stronie).

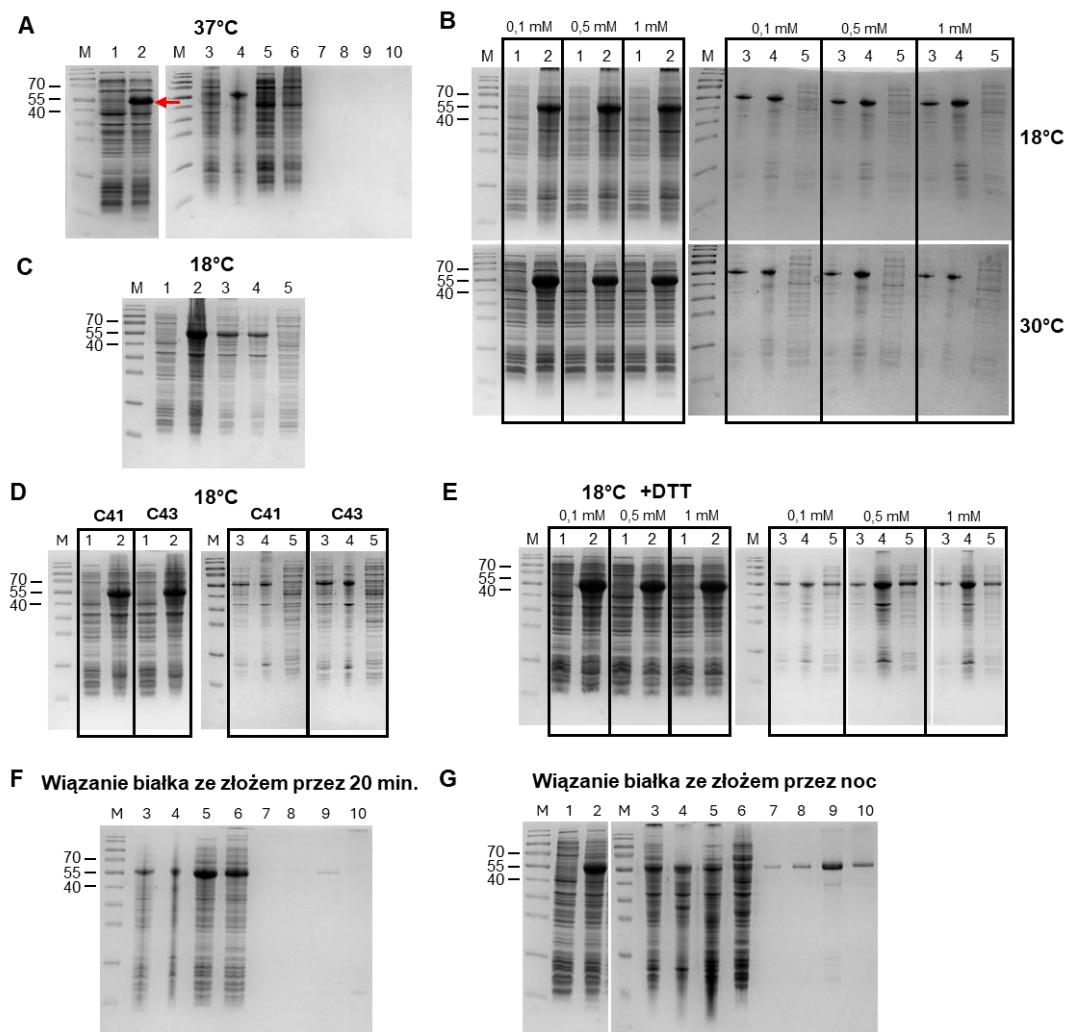
Po przeanalizowaniu, które reszty mogą być istotne z punktu funkcjonalności białka zajęłam się porównaniem sekwencji aa białek: LytA_27 i Ts2631. W ten sposób zidentyfikowałam aminokwasy, które można podstawić na te, które u endolizyny Ts2631 odpowiadają za stabilność termiczną. Kolejno W102, W109 i P140 odpowiadały: M487, Y492, P523. Reszta W145 nie pokrywała się z żadną resztą białka LytA_27 (Ryc. 46). Porównałam też sekwencje aminokwasowe samej domeny amidazowej białka LytA_27 z sekwencją endolizyny Ts2631 i pokrycie sekwencji wyniosło 78%, z czego identyczność na poziomie 31,40% (NCBI Blastp), co jest niskim podobieństwem.

Przeprowadziłam jeszcze analizę predykcji mutacji (Materiały 3.11.2), w której metody, z których korzystałam niejednoznacznie określiły wpływ zamiany zarówno metioniny, jak i tyrozyny na białko. W przypadku M487W połowa predykcji wykazała pozytywny wpływ na stabilizację białka, z kolei druga połowa odwrotnie. W przypadku Y492W, tylko jeden program wskazał na pozytywny wpływ substytucji tyrozyny na tryptofan, jeden brak wpływu a pozostałe cztery destabilizację białka (Tab. S1). Biorąc pod uwagę całą analizę bioinformatyczną zdecydowałam się na wykonanie wariantu LytA_27-M487W_Y492. Tym razem wykonałam mutagenezę miejscowo-specyficzną. Zanim skupię się na wariancie, to najpierw opiszę przebieg nadprodukcji, oczyszczania i analizy biochemicznej białka LytA_27 typu dzikiego.

5.11.2.2 Nadprodukcja i oczyszczanie białka

Tak jak w przypadku każdego innego białka, po otrzymaniu konstruktów plazmidowych, na którym znajdował się gen kodujący białko LytA_27 najpierw przystąpiłam do transformacji komórek kompetentnych, a następnie do nadprodukcji w systemie prokariotycznym *E. coli* BL21(DE3). Nadprodukcja białka była efektywna, co można zobaczyć na Ryc. 47A. Pojawiły się jednak problemy z oczyszczaniem białka, ponieważ znajdowało się ono w warstwie z osadem, w formie nierozpuszczalnej.

Tak jak w przypadku pozostałych białek rozpoczęłam od optymalizacji nadprodukcji białka obniżając temperaturę do 18°C i 30°C oraz wykorzystując różne stężenia IPTG (0,1, 0,5 i 1 mM w stężeniu końcowym). Nadprodukcja białka okazała się zadowalająca (Ryc. 47B), jednak przeprowadzenie sonikacji i rozdziału supernatantu od osadu poprzez wirowanie pokazało, że białko dalej znajduje się w formie nierozpuszczalnej.



Ryc. 47. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczanie białka LytA_27. Nadprodukcja rekombinowanych białek w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) bądź *E. coli* C41(DE3), *E. coli* C43(DE3) po indukcji 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG przez 4 godzinach w 30°C, albo 37°C bądź przez 16 godzin w 18°C według oznaczeń na rycinie. Oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. **A** – nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka, czerwoną strzałką wskazany jest prążek odpowiadający wielkości LytA_27. **B** – optymalizacja nadprodukcji w 18°C i 30°C, nad prostokątami znajduje się stężenie, jakie wykorzystano przy danej nadprodukcji oraz przy następującej po niej sonikacji i wirowaniu lizatu. **C** – Nadprodukcja, gdzie bezpośrednio przed indukcją hodowli bakteryjnej inkubowana była przez 20 minut w 42°C. **D** – Nadprodukcja w systemie ekspresyjnym *E. coli* C41(DE3) i *E. coli* C43(DE3), stężenie IPTG 1 mM. **E** – Optymalizacja nadprodukcji z dodaniem 1 mM ditiotretitolu (DTT) podczas indukcji. Nad prostokątami wskazane jest stężenie IPTG, jakie dodano podczas nadprodukcji. **F** – oczyszczanie białka z wiązaniem złoża na kolumnie ze złożem kobaltowym przez 20 minut. **G** – wiązanie białka ze złożem przez noc.

Postanowiłam zmienić nieco podejście i spróbować wyindukować naturalne białka opiekuńcze, które znajdują się w *E. coli*. Białka opiekuńcze (ang. chaperone proteins) odpowiadają za poprawne fałdowanie białek. Najbardziej rozpowszechnione systemy w *E. coli* to GroEL-GroES oraz DnaK-DnaJ. GroEL wiąże się z nienatywnym białkiem, które jest nieprawidłowo, albo częściowo sfałdowane, co dzieje się w obecności adenozynotrifosforanu (ATP). Ko-opiekuńcze białko GroES w formie pierścienia otacza jamę GroEL, co tworzy środowisko sprzyjające fałdowaniu się substratu. Po zakończeniu fałdowania GroES oddysocjuje od GroEL, a poprawnie sfałdowane białko substratowe może się uwolnić²⁰⁶.

Kiedy hodowla bakteryjna osiągnęła OD₆₀₀ ~0,35 zwiększyłam temperaturę do 42°C (indukcja białek opiekuńczych) i prowadziłam inkubację przez 20 minut, by następnie schłodzić hodowlę, dodać IPTG do stężenia końcowego 1 mM i przenieść ją do 18°C, gdzie pozostawiłam ją na 16 godzin. Po odwirowaniu hodowli przystąpiłam do sonikacji osadu, który następnie odwirowałam. Po przygotowaniu próbek przeprowadziłam elektroforezę SDS-PAGE w celu weryfikacji skuteczności nadprodukcji w wyżej wymienionych warunkach. Tutaj także nie zaobserwowałam żadnego efektu, który przyczyniłby się do obecności białka w formie rozpuszczalnej (Ryc. 47C).

Tym razem postanowiłam wykorzystać inne szczepy bakteryjne, zostając przy tym samym systemie ekspresyjnym. Wykorzystałam *E. coli* C41(DE3) oraz *E. coli* C43(DE3). Oba szczepy są pochodnymi *E. coli* BL21(DE3), które zostały wyizolowane w warunkach selekcji nadprodukcji białka opartym o bakteriofagową polimerazę RNA T7 (tzw. „Walker strains”)²⁰⁷. W obu szczepach występują mutacje w obrębie promotora *lacUV5*, który reguluje poziom ekspresji genu polimerazy RNA T7. Mutacje te przyczyniły się do słabszej aktywności tego promotora a w konsekwencji mniejszej ilości produkowanej polimerazy RNA T7, niż u *E. coli* BL21(DE3). W efekcie prowadzi to do zmniejszonej nadprodukcji oczekiwanego białka, co zmniejsza obciążenie związane z systemami fałdowania białka oraz zmniejsza toksyczność. Białka trudne w ekspresji, np. błonowe bardziej prawdopodobnie pozostaną we frakcji rozpuszczalnej niż w ciałkach inkluzyjnych²⁰⁸. Idąc tym tropem stwierdziłam, że białko będzie miało więcej czasu na poprawne sfałdowanie i tym samym podczas oczyszczania powinnam je zaobserwować we frakcji z supernatantem. Po przeprowadzeniu transformacji prowadziłam nadprodukcję białek w 18°C i indukowałam 1 mM IPTG w stężeniu końcowym. Tutaj również nie zaobserwowałam białka w supernatancie. Zrezygnowałam z tego podejścia i wróciłam do zastosowania *E. coli* BL21(DE3).

Przyjrzałam się bliżej sekwencji białka i zauważyłam, że jest tam aż 13 cystein. Reszty cysteiny zawierają grupę tiolową (-SH). Tworzą mostki disulfidowe, które powstają podczas utleniania. Podczas nadprodukcji, gdzie metabolizm komórki jest zaburzony tworzy się środowisko, które sprzyja tworzeniu się wiązań disulfidowych. Podczas nadprodukcji białek komórka produkuje niesamowicie dużo białka w krótkim czasie. Nowe łańcuchy polipeptydowe, które jeszcze nie są zwinięte a znajdują się blisko siebie i mają wystawione reszty cysteiny na wierzchu mogą tworzyć przypadkowe mostki disulfidowe. Jeśli jedno białko stworzy wiązanie z innym białkiem, to nie powstanie właściwy produkt, który może się poprawnie sfałdować. Powstają wtedy agregaty, ciała inkluzyjne, które nie są rozpuszczalne i obserwujemy je w postaci osadu, po przeprowadzeniu sonikacji i rozdzielania frakcji białek poprzez wirowanie. DTT jest środkiem redukującym i dzięki niemu reszty cystein mogą pozostać w stanie zredukowanym, zapewniając poprawne tworzenie się mostków a tym samym sfałdowanie się białka. Dzięki dodaniu DTT prawdopodobnie będzie można zaobserwować białko we frakcji rozpuszczalnej (w supernatancie)²⁰⁹.

Przeprowadziłam nadprodukcję i w momencie dodawania IPTG dodałam także DTT do stężenia końcowego 1 mM. Tutaj indukcję prowadziłam w różnych warunkach, dodałam IPTG w 3 różnych stężeniach. Po przeprowadzeniu sonikacji i rozdzieleniu osadu od supernatantu na żelu poliakrylamidowym z elektroforezy SDS-PAGE ujrzałam prążek odpowiadający wielkości białka LytA_27 w supernatancie (Ryc. 47E). Tym samym uznałam, że udało mi się uzyskać formę rozpuszczalną białka i mogę przystąpić do oczyszczania.

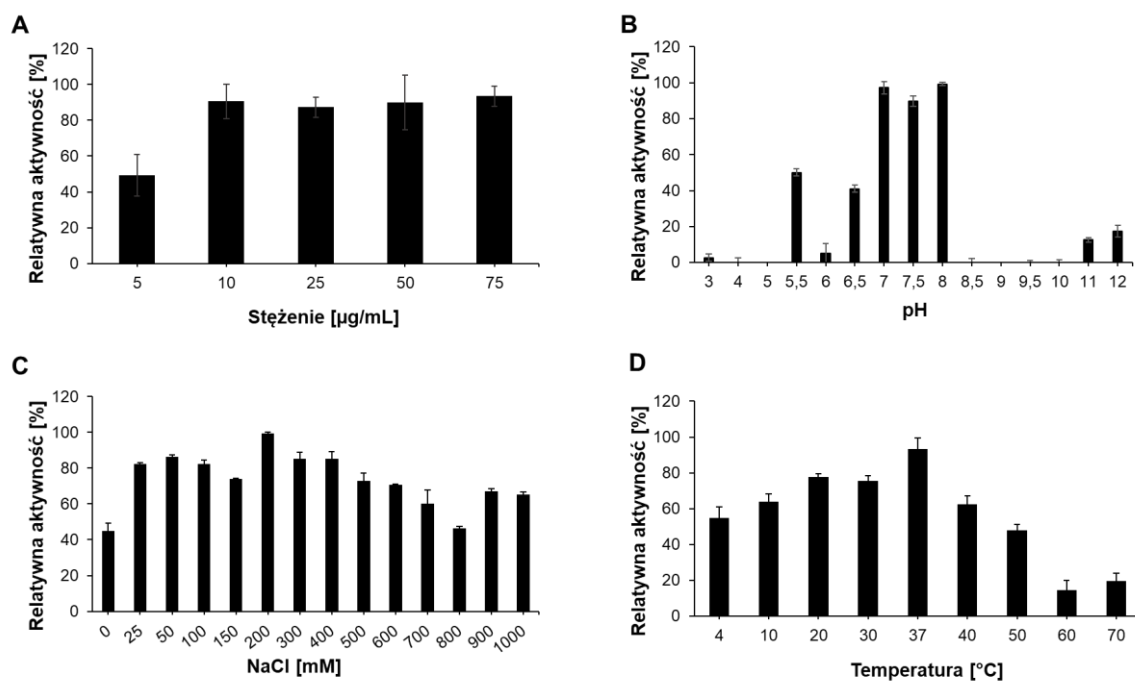
Najpierw powtórnie nadprodukowałam białko, gdzie podczas indukcji zastosowałam IPTG o stężeniu 0,5 mM i 1 mM DTT. Pierwsze oczyszczanie zakończyło się niepowodzeniem, gdyż białko nie związało się ze złożem kobaltowym w kolumnie. Mogło to być spowodowane obecnością DTT, który dodawałam do nadprodukcji. DTT redukuje jony Co^{2+} i powoduje ich odrywanie się od złoża, co można obserwować jako brązowy osad, który pojawia się na kolumnie. Nie zaobserwowałam zmiany koloru kolumny, natomiast 20 minut wiązania białka ze złożem mogło w tym przypadku nie wystarczyć. Postanowiłam więc wydłużyć czas wiązania białka ze złożem przez noc. Po wykonaniu tego kroku z sukcesem udało mi się wyeluować białko (Ryc. 47G) i po przedializowaniu do odpowiedniego buforu mogłam przejść do określenia warunków aktywności litycznej tego białka.

5.11.2.3 Charakterystyka funkcjonalna białka LytA_27

Do zbadania aktywności białka wykorzystałam TRZ. Ze względu na to, iż białko LytA_27 pochodzi z *C. beijerinckii* DSM 791, najpierw przygotowałam substrat z tej bakterii (metodę przygotowania opisałam szczegółowo w podrozdziale Metody 4.15.1. Rozpoczęłam od przetestowania aktywności białka w stężeniach: 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL i 75 µg/mL w buforze 20 mM HEPES, pH 7,4. Eksperyment prowadziłam przez 30 minut w 37°C. W stężeniu 5 µg/mL białko działało najmniej efektywnie, a w pozostałych stężeniach na podobnym poziomie, choć przy stężeniu 10 µg/mL najwolniej. W 25 µg/mL, 50 µg/mL i 75 µg/mL obserwowałam spadek OD₆₀₀ poniżej 0,2 już po 15 minutach, dlatego do kolejnych etapów doświadczeń wykorzystałam stężenie 25 µg/mL i skróciłam czas do 15 minut (Ryc. 48A).

Następnym krokiem była optymalizacja warunków do prowadzenia doświadczeń, dlatego zaczęłam od sprawdzenia pH. W tym celu zawieszałam substrat bakteryjny z *C. beijerinckii* w buforach o pH od 3 – 12 (skład buforów znajduje się w podrozdziale Materiały 3.7.4). Przebieg doświadczenia opisałam w podrozdziale Metody 4.15. Optymalne pH, w którym białko wykazywało aktywność lityczną mieściło się w zakresie od 7 – 8 (Ryc. 48B).

W kolejnym etapie wykorzystałam bufor 20 mM HEPES, pH 8,0 i dodawałam do niego NaCl, by w końcowym stężeniu zawierał sól w stężeniu od 0 – 1000 mM. W ten sposób przetestowałam wpływ soli na aktywność białka. Okazało się, że białko LytA_27 ma wysoką tolerancję na sól, bo przy 1 M NaCl nadal wykazywało aktywność na poziomie 65,16% (Ryc. 48C). Tak wysoka tolerancja na zasolenie może wynikać z budowy białka. LytA_27 posiada domenę wiążącą cholinę, która opiera się głównie na oddziaływaniach aromatycznych. Wysokie stężenie soli nie powinno zakłócić działania tej domeny²¹⁰. Sól ma także rolę stabilizującą białka. Zauważyłam, że bez dodatku NaCl białko wykazuje dużo niższą aktywność. Sól może np. wpływać na poprawne sfałdowanie się białka i przyjęcie odpowiedniej konformacji jego aktywnej formy²¹¹. Zdecydowałam się wybrać 200 mM NaCl do ostatniego testu, gdyż warunki te wydawały się być najbardziej optymalnymi dla aktywności litycznej białka.



Ryc. 48. Analiza aktywności białka LytA_27 w różnych warunkach. Pierwszy test (A) był prowadzony przez 30 minut w 37°C, przy zastosowaniu białka o różnym stężeniu w buforze: 20 mM HEPES, pH 7,4. Do pozostałych testów (B – D) użyto białko w stężeniu 25 µg/mL i reakcję prowadzono przez 15 minut oraz korzystano z różnych buforów. Substrat jaki zastosowano to: *Clostridium beijerinckii* DSM 791. **A** – testowanie różnych stężeń białka; **B** – test aktywności w zależności od pH buforu; **C** – test aktywności w zależności od stężenia NaCl w 20 mM HEPES, pH 8,0; **D** – test aktywności w buforze 20 mM HEPES, pH 8,0, 200 mM NaCl w zależności od temperatury.

W ostatnim teście sprawdziłam optymalną temperaturę działania enzymu. Białko z substratem inkubowałam przez 15 minut w temperaturach od 4°C do 70°C w buforze 20 mM HEPES, pH 7,4 z dodatkiem 200 mM NaCl. Białko wykazało aktywność już w 4°C na poziomie 54,68% w porównaniu do najbardziej optymalnej temperatury, jaką okazało się być 37°C. W temperaturze 60°C i 70°C aktywność ta spadała poniżej 20%. W związku z otrzymanymi wynikami bufor: 20 mM HEPES, pH 7,4 z dodatkiem 200 mM NaCl wykorzystałam do zbadania T_m wariantu białka: LytA_27-M487W_Y492W.

Zbadałam jeszcze spektrum aktywności litycznej białka LytA_27 wobec kilku wybranych szczepów bakteryjnych (Tab. 9). Prawdopodobna autolizyna LytA_27 ma wąskie spektrum aktywności. Względem *S. enterica* serowar Panama wykazuje aktywność na poziomie 40,82% przyjmując aktywność lityczną wobec *C. beijerinckii* jako 100%. Enzym wykazuje też nikłą aktywność wobec *P. aeruginosa* (14,61%) oraz *K. pneumoniae* (16,1%).

Tab. 9. Spektrum aktywności bakteriolytycznej białka LytA_27.

	Szczep	Relatywna aktywność [%] ± SD
Bakterie Gram-ujemne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 430	14,61 ± 3,43
	<i>Salmonella enterica</i> serowar Panama	40,82 ± 14,03
	<i>Acinetobacter baumannii</i> KPD 735	0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPD 298	16,10 ± 4,05
Bakterie Gram-dodatnie	<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 791	98,13 ± 2,34
	<i>Clostridium sporogenes</i> sp.	0
	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 23778	0
	<i>Bacillus megaterium</i> ATTC 14581	0
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0

LytA₂₇ nie wykazuje aktywności bakteriolytycznej w stosunku do szczepów: *A. baumannii*, *C. sporogenes*, *B. subtilis*, *B. megaterium* oraz *S. aureus*. Prawdopodobna autolizyna LytA₂₇ w swojej budowie zawiera domenę wiążącą cholinę oraz dwie domeny katalityczne: peptydazę cysteinową oraz amidazę. Cholina jest kowalencyjnie związania z kwasami teichojowymi. W aktywności bakteriolytycznej u *C. beijerinckii* bierze udział całe białko, ponieważ cholina występuje w ścianie komórkowej tej bakterii, z którą domena CBD może się wiązać. Natomiast w przypadku pozostałych wymienionych gatunków bakterii cholina nie występuje. Prawdopodobnie dwie pozostałe domeny katalityczne częściowo wiążą się z odsłoniętym peptydoglikanem wymienionych bakterii Gram-ujemnych (z wyjątkiem *A. baumannii*). U bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Klebsiella* peptydoglikan może posiadać modyfikacje, jak np. O-acetylacje i być gorzej dostępny od bakterii z rodzaju *Salmonella*²¹². Z kolei *A. baumannii* często posiada zmodyfikowane reszty w peptydoglikanie, przez co dla obcych hydrolaz pod względem chemicznym jest nierozpoznawalny²¹³.

S. aureus ma zupełnie inny typ peptydoglikanu (L-lizyna w trzeciej pozycji), stąd brak aktywności nie powinien dziwić. Natomiast w przypadku pozostałych bakterii Gram-dodatnich nawet jeśli peptydoglikan jest podobny, to mogą istnieć specyficzne modyfikacje i różne proporcje wiązań krzyżowych, przez co dość specyficzna autolizyna LytA₂₇, bez wsparcia

domeny wiążącej nie ma jak wchodzić w interakcję z substratem ani rozpoznawać miejsc cięcia²¹⁴.

5.11.2.4 Mutageneza miejscowo-specyficzna, nadprodukcja i oczyszczanie LytA_27-M487W_Y492W

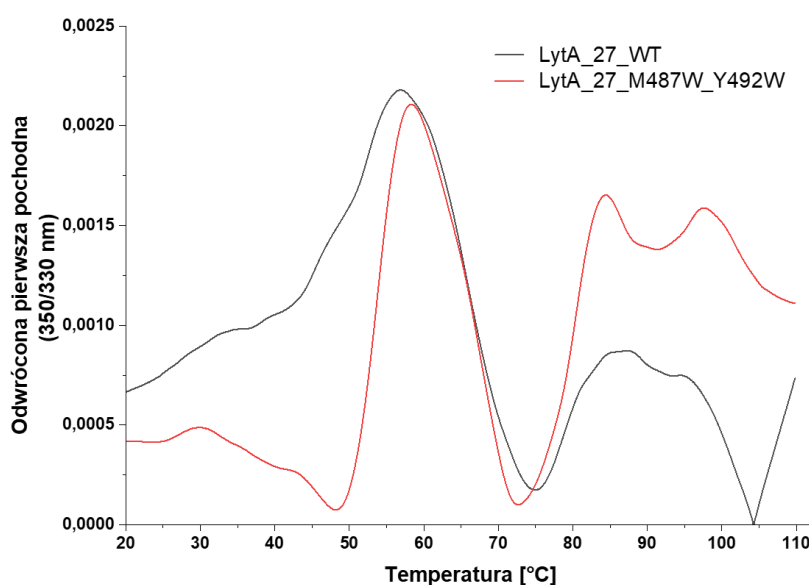
Syntezę starterów do przeprowadzenia mutagenezy miejscowo-specyficznej zleciłam firmie Genomed S.A. Następnie przeprowadziłam mutagenezę miejscowo-specyficzną (Metody 4.6). Do reakcji wykorzystałam matrycę (plazmid pET-15b z genem kodującym LytA_27) oraz startery, które 10-krotnie rozcieńczyłam. Niestety pierwsze próby mutagenezy się nie powiodły, ponieważ po weryfikacji otrzymania produktu na żelu agarozowym pojawiło się długie białe pasmo. Oznaczało to prawdopodobnie degradację matrycy. W reakcji kontrolnej nie dodałam matrycy i tam, tak jak w założeniu, nie obserwowałam żadnego produktu. Problem mogą stanowić inhibitory polimerazy, czy matryce bogate w pz GC. W takim przypadku dodatek BSA może zwiększyć wydajność reakcji PCR, m. in. przez oddziaływanie inhibitorów i stabilizację polimerazy oraz matrycy DNA^{215,216}. Podjęłam próbę optymalizacji reakcji PCR. Przygotowałam matrycę nierozcieńczoną oraz rozcieńczoną, do której dodałam BSA w stężeniu końcowym 50 µg/mL. Po przeprowadzeniu reakcji PCR zweryfikowałam jej przebieg poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Okazało się, że przy rozcieńczeniu matrycy, tam gdzie dodałam BSA białe pasmo, jakie wcześniej obserwowałam się nie pojawiło (Ryc. S6B,C). BSA wpłynęło pozytywnie na stabilność matrycy. Z drugiej jednak strony tam, gdzie użyłam nierozcieńczonej matrycy także nie obserwowałam rozmazania. Przy mutagenezie lepiej jednak użyć niższego stężenia matrycy, ponieważ zanieczyszczenie nią może być na tyle duże, że enzym DpnI nie zdegrduje jej w całości. Może to zakłócić późniejsze etapy eksperymentalne. Dlatego zdecydowałam się użyć 10-krotnie rozcieńczonej matrycy suplementowanej BSA.

Wykonałam transformację chemiczną komórek *E. coli* DH5α, by następnie wyizolować plazmid, który wysłałam do sekwencjonowania. Po uzyskaniu wyniku, który potwierdził, że udało mi się uzyskać wariant z oczekiwanymi mutacjami przystąpiłam do transformacji chemicznej komórek *E. coli* BL21(DE3) i nadprodukcji rekombinowanego białka LytA_27-M487W_Y492W. Nadprodukcję prowadziłam w tych samych warunkach, w których udało mi się nadprodukować i z sukcesem oczyścić białko typu dzikiego (indukcja w 18°C, 1 mM IPTG z dodatkiem 1 mM DTT przez 16 godzin). W tym przypadku niestety nie zachowałam żelu po oczyszczaniu, który mogłabym przedstawić w pracy.

5.11.2.5 Określenie T_m białka LytA_27 i wariantu LytA_27_M487W_Y492W

W przypadku wyników z testów aktywności wariantu nie pokazuję TRZ, gdyż wyniki są niepełne i muszą je powtórzyć w celu weryfikacji otrzymanych wyników. Natomiast prawdopodobnie wariant LytA_27-M487W_Y492W nie jest aktywny litycznie. Mimo to zdecydowałam się przeprowadzić analizę nanoDSF. Tym razem przygotowałam białko tylko w buforze, w którym analizowałam aktywność białka typu dzikiego. Wartości T_m dla obu białek są podobne: $56,94^\circ\text{C} \pm 0,12$ (LytA_27 typu dzikiego) oraz $58,55^\circ\text{C} \pm 0,32$ (LytA_27-M487W_Y492W). Wynik przebiegu wykonanej analizy nanoDSF zaprezentowałam na Ryc. 49. W obu przypadkach widać drugi pik prawdopodobnie ze względu na niejednorodną mieszaninę białkową. Mogło dojść do agregacji białka i ponownego rozfałdowania. W takim przypadku przeprowadza się SEC, tak jak zrobiłam to z LytO. Jednak podczas przeprowadzania SEC nie zaobserwowałam charakterystycznego pików, który by świadczył o elucji białka. SEC próbowałam wykonać dwukrotnie i za każdym razem efekt był ten sam. Niektóre białka też trzeba rozcieńczyć, ponieważ zbyt wysokie stężenie może być powodem agregowania białek. W moim przypadku stężenie to wynosiło $0,71 \text{ mg/mL}$ dla wariantu substytucyjnego i $0,4 \text{ mg/mL}$ dla białka typu dzikiego, dlatego też mało prawdopodobne jest, że w tym przypadku jest to wina stężenia, a raczej niejednorodnej populacji cząsteczek w zawiesinie^{217,218}.

Różnica w T_m to zaledwie $1,61^\circ\text{C}$ na korzyść wariantu LytA_27-M487W_Y492W. Metionina jest częściej spotykana u mezofilnych organizmów, natomiast u termofilów jest jej mniej. Dlatego też zamiana jej na tryptofan powinna promować wzrost stabilności termicznej.



Ryc. 49. Wynik nanoDSF określony dla prawdopodobnej autolizyny LytA_27 oraz jej wariantu LytA_27-M487W_Y492W. Określona została temperatura topnienia białka przy wykreśleniu pierwszej pochodnej

z fal o długości 350/330 nm, której odczyt zmieniał się wraz z wzrostem temperatury. Dla poprawy czytelności wykresu wartości z pierwszej pochodnej zostały pomnożone przez -1. Czarną linią oznaczony jest wynik dla białka typu dzikiego (WT) a czerwoną wariant (M487W_Y492W).

W teorii substytucja tyrozyny znajdującej się na α -helisie na tryptofan powinna sprzyjać stabilizacji białka ze względu na większą powierzchnię oddziaływań jaką tryptofan może zaoferować dzięki pierścieniowi indolowemu. Wprowadzenie tryptofanu mogło przyczynić się do stworzenia bardziej hydrofobowego środowiska i zmniejszeniu lokalnej dynamiki konformacyjnej. Zamiana metioniny, która znajdowała się na pętli na tryptofan także mogła ograniczyć lokalną dynamikę konformacyjną. Wariant M487W mógł wejść w interakcję z resztą Y481, która znajduje się kilka aa dalej na pętli, albo z Y492W. Mogłoby to bardzo ograniczyć dynamikę konformacyjną wpływając na całą domenę i nieznacznie podnieść T_m białka.

5.11.3 Lyc2

Białko Lyc2 to prawdopodobnie enzym autolityczny o długości 256 aa, masie molekularnej 28,26 kDa i teoretycznie wyznaczonym pI 8,36, który pochodzi z *C. felsineum* DSM 794. Bakteria, z której pochodzi białko to anaerob, który odgrywa rolę w rozkładzie pektynolitycznym materiału roślinnego²¹⁹.

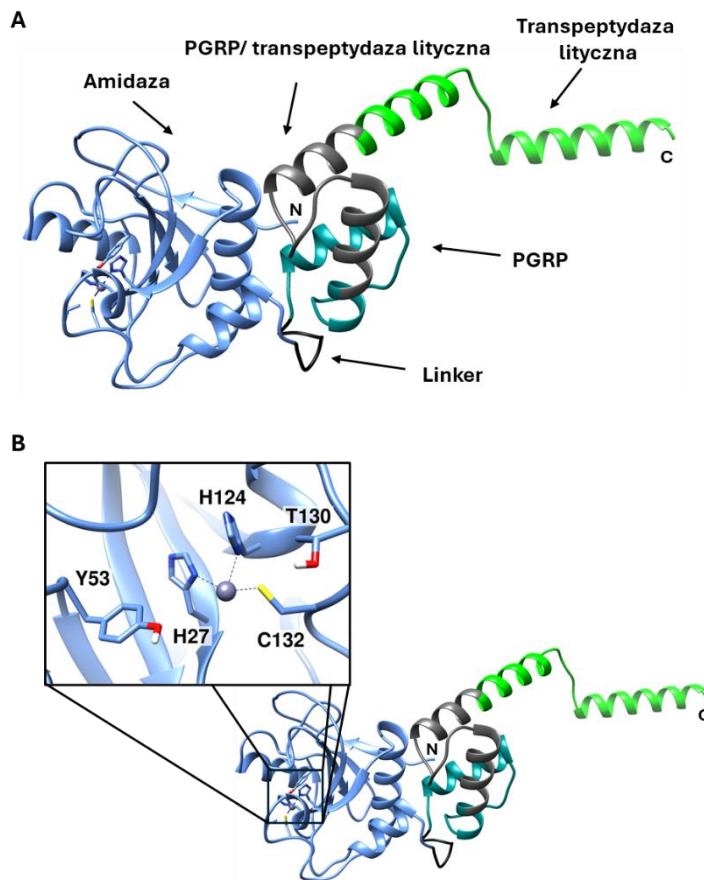
5.11.3.1 Analiza bioinformatyczna

Podczas moich pierwszych poszukiwań strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 o pochodzeniu mezofilnym znalazłam białko pod nazwą Lyc2 (GenBank: OOL92448). Podczas kolejnych poszukiwań i wglębianie się w historię białka okazało się, że występuje ono pod jeszcze dwoma numerami akcesyjnymi, o dwóch innych nazwach: CLFE_0289 (GenBank: URZ16849), oraz PGRP *C. felsineum* (GenBank: WP_077892889). Prawdopodobnie podczas pierwszego dodania sekwencji tego białka do bazy popełniono błąd. W kolejnym dodanym zestawie danych w GenBanku podczas przeglądania sekwencji genomu *C. felsineum* natknęłam się na nazwę białka Lyc2 z inną sekwencją aminokwasową, dłuższą niż prawdopodobna auolizyna jaką się zajmuję. Natomiast białko, które w tej pracy przedstawiam było nienazwane. Ze względu na to, że początkowo przy przeszukiwaniach natknęłam się na nazwę „Lyc2”, już przy niej zostałam.

Białko Lyc2. Jest zbudowane z dwóch domen. Na N-końcu znajduje się amidaza N-acetylmuramylo-L-alaninowa, homolog strukturalny egzaminowanej endolizyny Ts2631. W skład centrum katalitycznego tej domeny u Lyc2 wchodzi H27, H53, H124, T130 i C132,

z czego H27, H124 i C132 koordynują jon Zn^{2+} (Ryc. 50B). W rowku wiążącym PGN, znajdują się reszty: H28, A29, A49, Y53, R67, A74, H75, N80, H124, Y128, T130, S131 i C132. Domena amidazowa białka LysC strukturalnie najbardziej jest podobna do białka LysC (RMSD 1,3), tego samego, co domena amidazowa białka LytA_27, a sekwencja aa domeny amidazowej LysC wykazuje trochę wyższe podobieństwo aa do LysC niż LytA27, bo 40%.

Drugą domeną LysC znajdującą się na C-końcu białka jest domena wiążąca peptydoglikan hydrolaz peptydoglikanowych, która nachodzi na siebie z transpeptydazą YcbB/YkuD. Fragment PGRP występuje między V164 a Q218. Kolejny fragment, który wskazuje się jako transpeptydazę mieści się pomiędzy Q191 a K256. D-D-transpeptydazy biorą udział w dojrzewaniu peptydoglikanu, gdzie końcowym etapem reakcji jest utworzenie nowego wiązania peptydowego między D-Ala w czwartej pozycji a grupą aminową mDAP innej podjednostki peptydowej w trzeciej pozycji. Tutaj zaangażowane są białka wiążące peptydoglikan (*ang. Peptidoglycan Binding Protein, PBP*). Wymieniona tutaj transpeptydaza należy do rodziny L,D-transpeptydaz, które katalizują powstawanie wiązań, gdzie D-Ala jest usuwana i następuje połączenie dwóch reszt m-DAP sąsiadujących łańcuchów peptydowych^{220,221}. Biorąc pod uwagę wszystkie dane, białko wygląda na autolizynę, która przebudowuje peptydoglikan w trakcie wzrostu komórki.

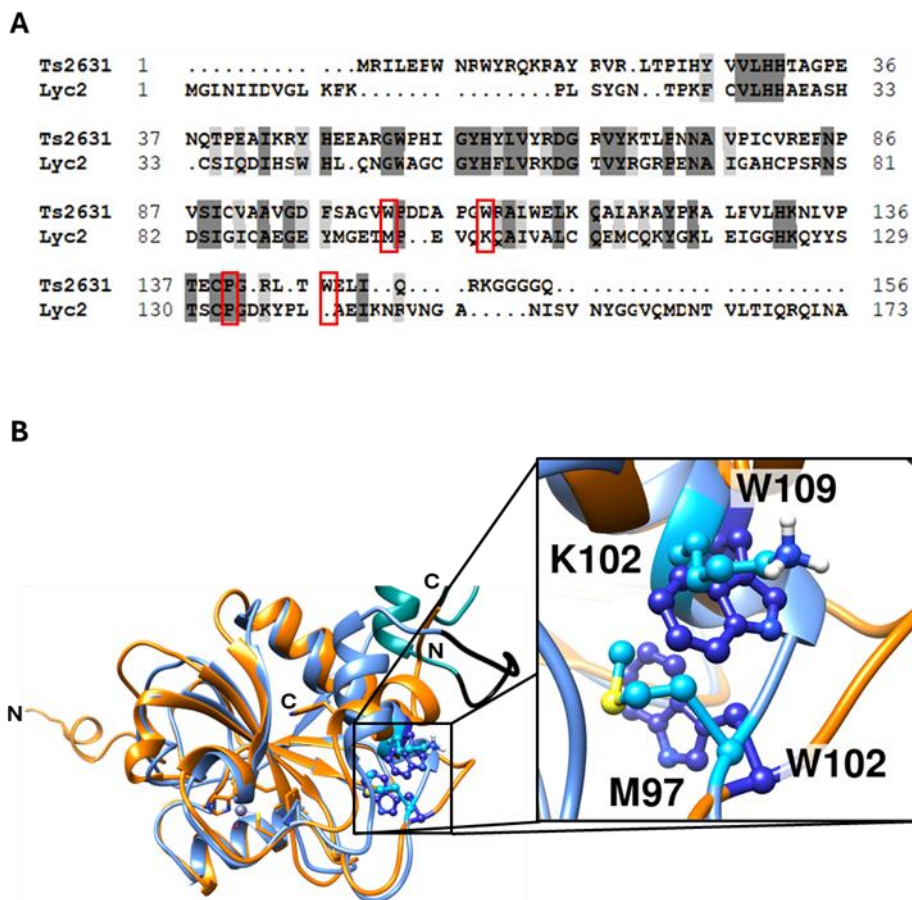


Ryc. 50. Model przestrzenny Lyc2. **A** – zaznaczone są domeny występujące w białku. **B** – Zbliżenie na centrum katalityczne białka Lyc2 w domenie amidazy.

Strukturalnie najbardziej podobnym białkiem dla części domeny, która jest rozpoznana jako białko wiążące peptydoglikan to N-końcowa domena białka SleB (PDB: 6TCI; RMSD 1,6 według DALI). Podobieństwo w sekwencji to 34%, ale białko to nie jest opisane w literaturze. Najlepiej dopasowanym białkiem według DALI, które jest opisane w literaturze było AmpDh2 (PDB: 4BPA), które pochodzi z *P. aeruginosa*, a podobieństwo sekwencji wyniosło 22%. Podobieństwo to także dotyczyło fragmentu domeny PGRP. Przeszukując za pomocą DALI, Foldseek, jak i BLASTp nie znalazłam, żadnej podobnej struktury, czy sekwencji we fragmencie K219 – K256, jest to unikalny fragment.

Następnie porównałam ze sobą sekwencje białka Lyc2 oraz endolizyny Ts2631. W wyniku tego porównania zauważyłam, że aminokwasom W102, W109 i P140 z sekwencji endolizyny Ts2631 odpowiadają kolejno: M97, K102 i P133 z sekwencji Lyc2. Z kolei reszcie W145 nie pokrywał się z żadnym aa. Porównanie sekwencji endolizyny Ts2631 z domeną amidazową białka Lyc2 pokazało, że sekwencje pokrywają się w 74%, ale ich podobieństwo

też jest niskie, jak w przypadku pozostałych badanych przeze mnie białek i wynosi 32,76% (NCBI BLASTp).

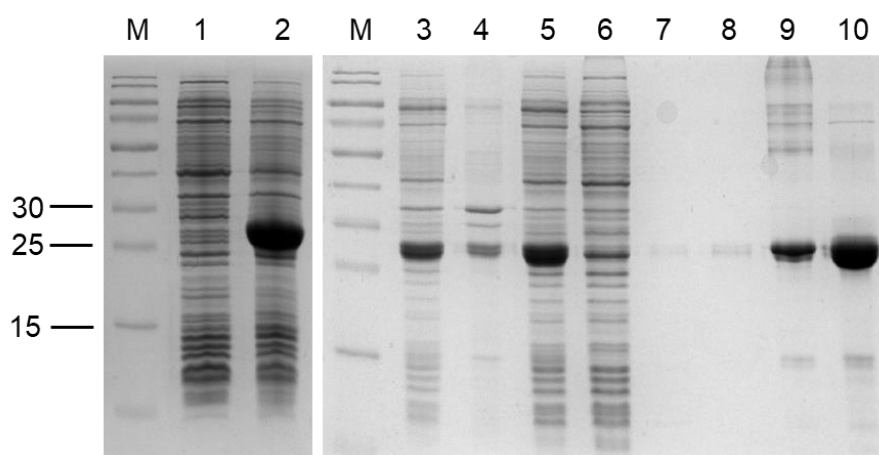


Ryc. 51. Porównanie sekwencji endolizyny Ts2631 i prawdopodobnej autolizyny Lyc2. A – Porównanie sekwencji aminokwasowych endolizyny Ts2631 i białka Lyc2. Szare prostokąty pokazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacieniowania: 100%). B – Model przestrzenny Lyc2 (na niebiesko) oraz struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG, na pomarańczowo), gdzie zaznaczone są dwie reszty odpowiadające za stabilność termiczną u endolizyny Ts2631 (W102, W109) oraz odpowiadające im w sekwencji reszty białka Lyc2 (M97, K102).

Po przeanalizowaniu krytycznych miejsc dla aktywności białka, wiedząc, że reszty, które mogą zamienić to: M97 i K107 przesłałam do predykcji wpływu mutacji na stabilność białka. Dwa narzędzia do predykcji pokazały, że zmiany te pozytywnie wpłyną na stabilność białka, a 4 pokazały efekt destabilizujący (Tab. S1). W związku z takim wynikiem za pomocą analizy bioinformatycznej nie mogę stwierdzić, czy wariant Lyc2_M97W_K102W będzie stabilnym białkiem.

5.11.3.2 Oczyszczanie białka

Po otrzymaniu konstruktów plazmidu z genem *lyc2* przeprowadziłam transformację komórek *E. coli* BL21(DE3) oraz *E. coli* DH5 α , by kolejno móc przeprowadzić nadprodukcję oraz przechować plazmid. W przypadku białka Lyc2 nie napotkałam problemów z nadprodukcją ani z oczyszczaniem, co było miłą odmianą po problemach z wcześniej oczyszczanymi białkami. Zdjęcie żelu poliakrylamidowego reprezentujący kolejne etapy nadprodukcji i oczyszczania zaprezentowałam na Ryc. 52. Stężenie białka po tym oczyszczaniu było bardzo wysokie, bo wyniosło 11,84 mg/mL. Muszę jednak dodać, że stężenie białka określiłam po dializie do buforu, który zawierał 50% glicerol.

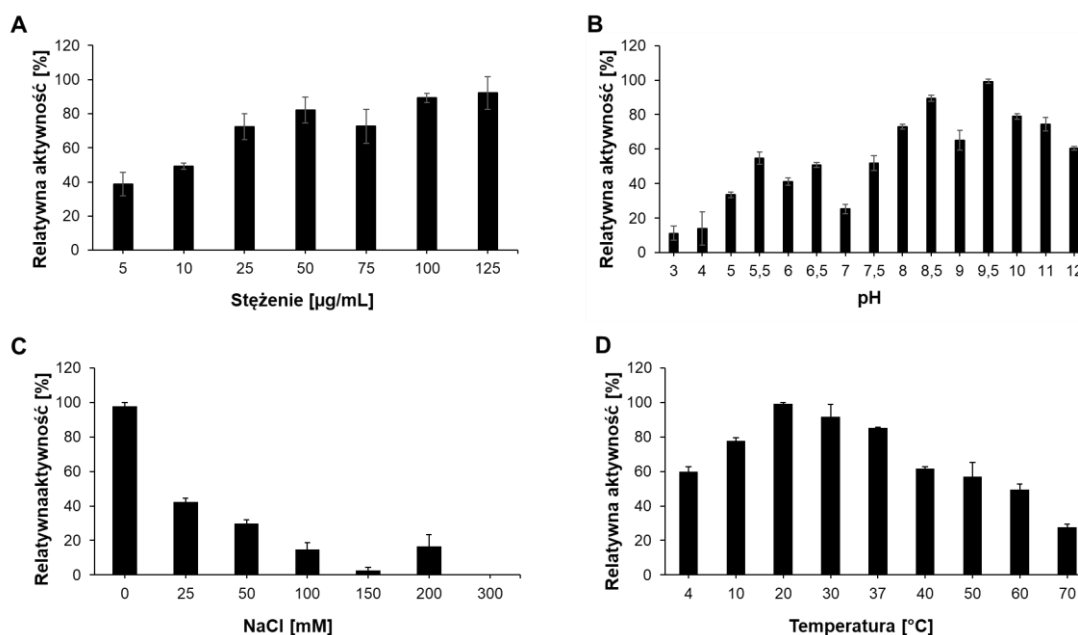


Ryc. 52. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka Lyc2. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja w systemie ekspresyjnym *E. coli* po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji, 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu.

5.11.3.3 Charakterystyka funkcjonalna białka Lyc2

Po oczyszczeniu białka przeszłam do wyznaczenia optymalnych warunków aktywności litycznej białka Lyc2. Rozpocząłem od sprawdzenia stężenia białka, jakie powinnam wykorzystać do dalszych doświadczeń. W tym celu najpierw przygotowałam substrat bakteryjny (zgodnie z procedurą umieszczoną w podrozdziale 4.15.1) z komórek *C. felsineum* DSM 794, czyli bakterii, z której to białko pochodzi. Do doświadczenia wykorzystałam białko w przedziale stężeń od 5 – 125 μ g/mL. Reakcję musiałam prowadzić przez 2 godziny, aby zaobserwować efektywną lizę komórek bakteryjnych, czyli OD₆₀₀ w okolicy 0,2. Wyniki

zaprezentowane są na Ryc. 53A. W przypadku stężeń 100 i 125 $\mu\text{g/mL}$ białko wykazało najbardziej efektywne działanie, a do dalszych eksperymentów wybrałam stężenie 100 $\mu\text{g/mL}$. Dwie godziny to dość długi okres działania. Jednak spodziewam się, że wynika to z mechanizmu działania tego białka. Prawdopodobnie białko Lyc2 najpierw hydrolizuje wiązania między resztą cukrową a pierwszym aminokwasem w peptydzie, co robi N-końcowa amidaza typu 2 a następnie białko mocniej kotwyczy się w peptydoglikanie za pomocą domeny wiążącej, by następnie zadziałała transpeptydaza, która tworzy wiązania krzyżowe typu 3-3.



Ryc. 53. Analiza optymalnych warunków aktywności litycznej białka Lyc2. Aktywność była mierzona za pomocą testu redukcji zmętnienia, za pomocą którego mierzy się spadek gęstości optycznej przy długości fali 600 nm. Zastosowanym substratem były komórki bakteryjne *C. felsineum* DSM 794. Test prowadzono w 37°C przez 2 godziny. **A** – Aktywność białka w zależności od stężenia w buforze 20 mM HEPES, pH 7,4. **B** – Wpływ pH na aktywność bakteriolityczną Lyc2. **C** – Wpływ NaCl na białko Lyc2. **D** – Optymalna temperatura dla aktywności bakteriolitycznej białka.

W kolejnym kroku sprawdzałam wpływ pH na aktywność białka. Białko wykazało dość szerokie spektrum działania, gdzie najwyższe zachowało w pH 9,0, potem w pH 8,5 oraz 8,0. Im kwaśniejsze pH, tym niższa aktywność, gdzie w pH 3,0 było to zaledwie 11,27% relatywnej aktywności (porównując do pH 9,0, jako 100% aktywności białka). Białko zachowało swoją aktywność relatywnie wysoko w pH zasadowym, gdzie w pH 12,0 wyniosło ono 60,58% aktywności (Ryc. 53B). Z racji, że w pH 8,0 białko nadal utrzymało aktywność na poziomie 73,04% i w laboratorium standardowo używałam buforu 10 mM KPi, pH 8,0 do TRZ, to zdecydowałam się wykorzystać ten bufor do dalszych analiz.

Kolejno zbadalam wpływ siły jonowej na aktywność białka. W tym celu korzystając z buforu 10 mM Kpi, pH 8,0 dodałam NaCl o różnych stężeniach. Białko Lyc2 traciło aktywność wraz ze wzrostem stężenia soli zaczynając już od 25 mM, gdzie porównując aktywność tego białka do działania bez NaCl, wynosiło ono już zaledwie 42,22%. W 300 mM białko już nie wykazało żadnej aktywności (Ryc. 53C).

Następnie sprawdziłam, jaka jest optymalna temperatura dla działania białka. Okazało się, że jest to 20°C, ale już w 4°C białko wykazywało 59,62% aktywności porównując do 20°C. W 37°C było to już 85,26% i aktywność spadała wraz z wzrostem temperatury, gdzie w 70°C było to już zaledwie 27,62% aktywności (Ryc. 53D). Do przeanalizowania spektrum działania enzymu postanowiłam wybrać temperaturę 37°C, jako że skupiłam się na zbadaniu aktywności litycznej wobec bakterii mezofilnych, a białko w tej temperaturze zachowało wysoki poziom aktywności.

Zaobserwowałam, że białko to jest aktywne wobec *A. baumannii* i *Clostridium sporogenes* nawet w wyższym stopniu niż *C. felsineum*. Białko Lyc2, było jeszcze aktywne w 62,18% wobec *B. megaterium* (jako 100% przyjąłam aktywność wobec *A. baumannii*, gdzie spadek OD₆₀₀ był najwyższy), w 49,0% i 40,6% kolejno przeciw *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*. W stosunku do *B. subtilis* było to już zaledwie 15,2% a na *S. aureus* nie zadziało wcale (Tab. 10). Wspominałam już, że autolizyny są specyficzne, co do gatunku bakterii, jednak biorąc pod uwagę analizę bioinformatyczną, jaką wykonałam dla białka Lyc2 oraz budowę peptydoglikanu bakterii, wobec których białko jest aktywne można to zjawisko szerszego spektrum działania spróbować wytłumaczyć.

Wszystkie z wymienionych bakterii posiadają ten sam typ peptydoglikanu, czyli A1 γ , z wyjątkiem *S. aureus* o typie A3 α . A1 γ posiadają m-DAP w trzeciej pozycji peptydu macierzystego, natomiast w A3 α w peptydzie występuje L-lizyna i obecny jest mostek peptydowy składający się z 2 do 7 reszt aa. U *S. aureus* jest to mostek pentaglicynowy. Peptydoglikan *B. subtilis* od *B. megaterium* różni się tym, że u *B. megaterium* m-DAP żadna z grup karboksylowych nie ulega amidacji. Natomiast u *B. subtilis* większość podjednostek peptydowych w obrębie grupy karboksylowej związanej z atomem węgla o konfiguracji D w m-DAP.¹⁹¹ Na dodatek *B. subtilis* posiada bardzo usieciowany peptydoglikan oraz duże zagęszczenie kwasów tejchojowych, co może utrudniać dostęp enzymu do peptydoglikanu. W przypadku bakterii *K. pneumoniae* oraz *P. aeruginosa* w budowie ich peptydoglikanu występuje więcej modyfikacji typu O-acetylacja, czy deaminacja m-DAP, albo też duże zróżnicowanie w muropeptydzie^{212,222}. Z kolei wyższa aktywność lityczna w stosunku do

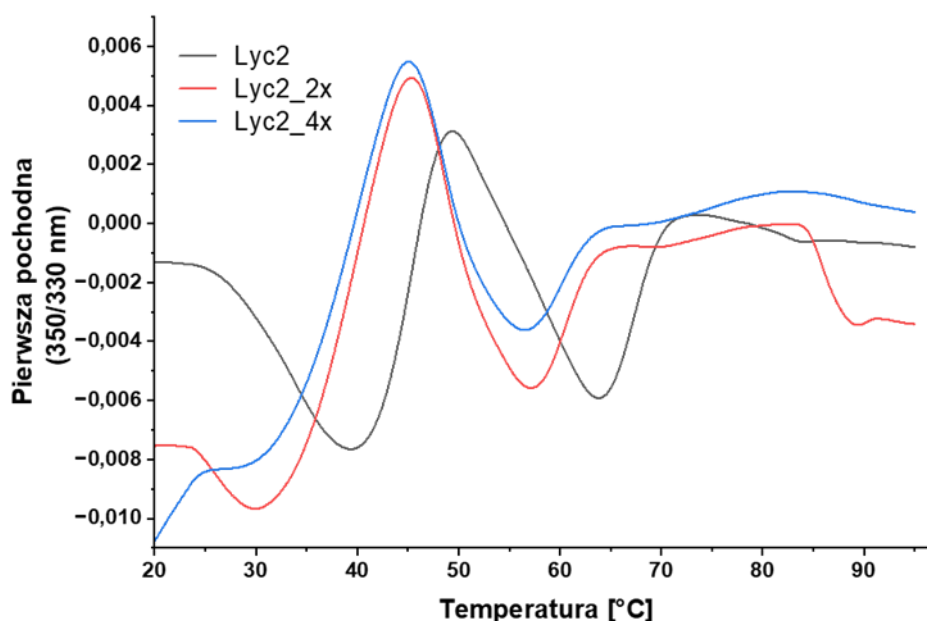
A. baumannii może wynikać z obecności wiązań katalizowanych przez L,D-transpeptydazy z domeną YkuD²²³. Podobnie jest u *C. sporogenes*, gdzie zdecydowana większość wiązań to mogą być właśnie wiązania poprzeczne 3-3 tworzone przez L,D-transpeptydazy (nie znalazłam badań wskazujących na udział transpeptydacji w tym gatunku, natomiast jest on dobrze zbadany u *Clostridium difficile*, gdzie L,D-transpeptydacja zdecydowanie przeważa nad D,D-transpeptydacją)²²⁴. Skoro białko posiada domenę transpeptydazy, to PBP może rozpoznawać region potrzebny dla transpeptydazy. Białko potrzebuje do działania aż 2 godzin. Przypuszczam, że amidaza tnie wiązania pomiędzy pierwszych aa w peptydzie a resztą cukrową rozluźniając strukturę PGNu i białko wydajniej kotwiczy się PGNie za pomocą domeny wiążącej. Następnie transpeptydaza działając jak klej tworzy wiązania poprzeczne. To opóźnia cały proces lizy, ale ponieważ białko dodawane jest z zewnątrz do substratu, martwych komórek i system ten nie może być w żaden sposób regulowany, to hydroliza wiązań następuje szybciej a ostatecznie dochodzi do lizy. Działając na żywych komórkach bakteryjnych mogłabym sprawdzić, jak ten proces zachodzi. Moje przypuszczenia opieram też na tym, że zbadano mechanizm regulacji wielu autolizyn, co prawda transglikozylaz, u *Vibrio cholerae* poprzez L,D mostki poprzeczne. Nawet niewielka ilość utworzonych wiązań poprzecznych skutecznie hamowała działanie autolizyn⁴⁶. Obecna w Lyc2 domena transpeptydazy może być takim regulatorem. W celu otrzymania białka, który faktycznie mógłby być zastosowany jako substancja bakteriologiczna należy rozważyć usunięcie części domeny transpeptydazy zostawiając tylko domenę amidazową i PGRP.

Tab. 10. Spektrum aktywności białka Lyc2 wobec kilku przedstawicieli bakterii mezofilnych.

	Szczep	Relatywna aktywność [%] ± SD
Bakterie Gram-ujemne	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPD 298	49,00 ± 1,44
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPD 430	40,61 ± 2,52
	<i>Acinetobacter baumannii</i> KPD 735	95,55 ± 4,74
	<i>Clostridium felsineum</i> DSM 794	83,19 ± 1,72
Bakterie Gram-dodatnie	<i>Clostridium sporogenes</i> sp.	91,00 ± 5,69
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATTC25923	0
	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 23778	15,20 ± 3,94

5.11.3.4 Lyc2 określenie T_m

Do określenia wartości T_m wykorzystywałam nanoDSF. W tym celu przygotowałam białko według procedury opisanej w podrozdziale Metody 4.20. Białka Lyc2 początkowo nie rozcieńczałam, tylko wykonałam pomiar przy stężeniu 1,86 mg/mL. Początkowo wynik jaki otrzymałam był niejasny, nie wskazywał, gdzie występuje moment, który można określić jako T_m . Tym razem nie przeprowadziłam SEC, ale od razu przeszłam do rozcieńczenia białka, najpierw 2-krotnego, a następnie 4-krotnego. Po wykonaniu pomiarów zauważyłam istotne różnice. Widma, które mogły wskazać, w którym momencie białko jest w 50% w formie rozfałdowanej z dwóch kolejnych pomiarów nakładały się ze sobą. Temperatura topnienia dla białka Lyc2 zgodnie z analizą nanoDSF to $45,04^\circ\text{C} \pm 0,02$ (Ryc. 54), którą wyznaczyłam na podstawie 4-krotnego rozcieńczenia.



Ryc. 54. Analiza nanoDSF białka Lyc2. Każdy eksperyment był przeprowadzony przy wykorzystaniu 4 kapilar. Białka były zawieszone w 10 mM buforze fosforanowo-potasowym, pH 8,0 z dodatkiem 10% glicerolu.

Zaobserwowałam, że wraz ze wzrostem rozcieńczenia poziom szumów wycisza się. Może to być spowodowane tym, że przy zbyt wysokim stężeniu białka tworzą się agregaty. Najpierw białko się rozfałdowywało, potem tworzyło agregaty, które znów ulegały rozfałdowaniu wraz ze wzrostem temperatury, co jest szczególnie widoczne przy nierozcieńczonym białku (Ryc.

54, czarna linia). Przy stężeniu 0,46 mg/ mL (Ryc. 54, niebieska linia) można zauważyć, że przejścia pomiędzy stanem, gdzie białko jest w połowie rozfałdowane a możliwymi artefaktami jest wyraźnie odcięte i jest ich mniej nawet niż w przypadku 2-krotnego rozcieńczenia.

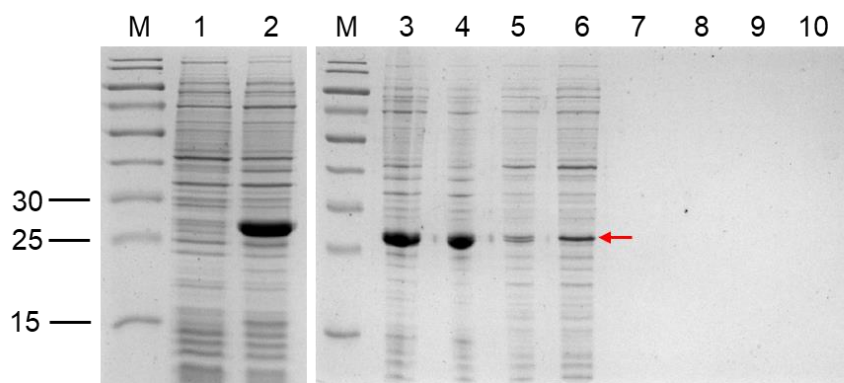
5.11.4 Mutageneza miejscowo specyficzna Lyc2

Mutagenezę miejscowo specyficzną przeprowadziłam zgodnie z instrukcją zawartą w podrozdziale Metody 4.6. Syntezę starterów zleciłam firmie Genomed. Wynik reakcji PCR w celu weryfikacji sprawdziłam poprzez elektroforezę agarozową. Na żel naniosłam 10 μ L z 50 μ L z próbki, w której zachodziła reakcja (Ryc. S6D). Widząc pomyślny wynik przesłam do dalszych etapów i po inkubacji próby z enzymem DpnI przeprowadziłam transformację chemiczną komórek *E. coli* DH5 α , by następnie wyizolować plazmid, który wysłałam do sekwencjonowania. Po otrzymaniu pomyślnego wyniku wykonałam transformację chemiczną komórek *E. coli* BL21(DE3), by następnie przeprowadzić nadprodukcję.

5.11.4.1 Nadprodukcja i oczyszczanie białka Lyc2_M97W_K102W

Nadprodukcję białka przeprowadziłam w 37°C przez 4 h po indukcji hodowli bakteryjnej 1 mM IPTG. Nadprodukcja przebiegła z wysoką wydajnością. Przesłam do oczyszczania, jednak po weryfikacji efektywności tego procesu zauważyłam, że bardzo duża ilość białka znajduje się we frakcji z osadem i białko nie związało się ze złożem w kolumnie, ponieważ znajdowało się we frakcji z przesączem białek. W związku z tym sprawdziłam, czy wydłużenie wiązania przez noc pomoże, tak jak było to w przypadku białka LytA_27. Jednak w tym przypadku ta praktyka zawiodła. Reprezentacyjny żel znajduje się na Ryc. 55. Upewniłam się, czy w wyniku z sekwencjonowania fragmentu plazmidu z genem kodującym interesujące mnie białko na pewno znajduje się znacznik histydynowy. Wynik był jednoznaczny, znacznik był obecny na N-końcu białka.

Czasem dzieje się tak, że białko podczas nadprodukcji fałduje się w taki sposób, że zwija znacznik histydynowy do środka białka²²⁵. Wtedy należałoby prawdopodobnie oczyścić białko z frakcji z osadem poprzez wykorzystanie mocznika, gdzie białko ulegnie denaturacji, a następnie ponownie się je renaturuje. Nie wiem jednak, czy proces ten nie wpłynąłby znacznie na aktywność białka. Potrzebne są dalsze etapy pracy eksperymentalnej, które przyczynią się do oczyszczenia wariantu białka Lyc2 i możliwe będzie zbadanie jego aktywności oraz T_m .



Ryc. 55. Nadprodukcja i oczyszczanie wariantu M97W_K102W rekombinowanego białka Lyc2. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. Czerwoną strzałką wskazany jest prążek odpowiadający wielkości wariantu białka Lyc2-M97W_K102W.

5.12 Podsumowanie analizy dotyczącej strukturalnych homologów endolizyny Ts2631

Założeniem drugiej części projektu była poprawa stabilności termicznej strukturalnych homologów endolizyny Ts2631, które pochodzą z organizmów mezofilnych. Chcąc podnieść stabilność termodynamiczną białka, której potwierdzenie obserwowałam oceniając T_m białka, jednocześnie zamierzałam podnieść stabilność kinetyczną, dokonując pomiaru aktywności białka w określonej temperaturze. Wymienione założenie udało mi się dokonać tylko w przypadku domeny amidazowej białka LytO, gdzie w wariancie LytO-Q115W_F179W T_m podniosłam o 9,7°C. Zaobserwowałam też wyższą aktywność białka w 60°C w porównaniu do białka typu dzikiego (22% vs 7%, Ryc. 42). Mimo, że aktywność jest nikła, to jednak statystycznie istotnie wyższa.

W przypadku endolizyny K11gp3.5 stabilność termodynamiczna została zaburzona i białko uległo destabilizacji. W przypadku kolejnych trzech białek napotkałam na szereg problemów związanych z oczyszczaniem ich, bądź wariantów. Białka O3I do tej pory nie udało się oczyścić. W przypadku białka LytA_27 i wariantu LytA_27-M487W_Y492W określiłam T_m , bez potwierdzenia, czy wariant tego białka jest aktywny litycznie. Tutaj obserwowałam niewielką różnicę, bo 1,6°C, na korzyść wariantu białka LytA_27-M487W_Y492W. Dla białka

Lyc2 określiłam T_m (45,0°C), natomiast wciąż stoi przede mną wyzwanie oczyszczenia jego wariantu Lyc2-M97W_K102W. Podsumowanie dotyczące wyników z pomiaru T_m oraz informacja, dla których białek została określona aktywność znajduje się w Tab. 11.

Tab. 11. Podsumowanie charakterystyki strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 pochodzenia mezofilnego – temperatura topnienia (T_m) oraz aktywność lityczna. „*” – T_m określona w buforze PBS, pH7,4; „+” – białko aktywne; „-” – białko nieaktywne; no – nie określono.

Wariant białka	T_m	Aktywność
K11gp3.5*	63,00 °C	+
K11gp3.5-M101W_N91W_Q137W	no	-
K11gp3.5-N91W_Q137W*	56,77°C	+
K11gp3.5-F96W_L136W	no	no
LytO amidaza*	47,89°C	+
LytA amidaza-Q115W_F179W*	57,62°C	+
O3I	no	no
LytA_27	56,94°C	+
LytA27_M487W_Y792W	58,55°C	no
Lyc2	45,04°C	+
Lyc2_M97W_K102W	no	no

6. Wnioski

Badacze od wielu lat starają się rozwiązać zagadkę, jaką stanowi stabilność termiczna białek. W dobie coraz większego nacisku na otrzymanie efektywnych i stabilnych leków zwalczających patogeny (i nie tylko) badania nad tym zagadnieniem zyskują coraz większe znaczenie. Na podstawie badań, takich jak te dotyczące Paliferminu¹⁸⁰, widać, że da się wpłynąć na stabilność substancji białkowej zwiększając jej stabilność termiczną i skutecznie poprawić jego użyteczność. WHO także wskazuje na to, że szczególnym problemem jest przechowywanie leków, szczególnie w miejscach, gdzie jest wysoka temperatura i wilgotność⁸⁴.

Do badań nad termostabilnością stosuje się różne podejścia. Można skupić się na sekwencji nukleotydowej, gdzie mówi się o tym, że termostabilne białka są bogate w pz GC¹⁵⁰, jednak wielu badaczy skupia się wokół aminokwasów i ich roli w stabilności⁹⁷. Porównanie sekwencji aminokwasowej między mezofilami, termofilami i psychrofilami pomaga nam lepiej zrozumieć biologię białek. Wydaje się jednak, że znaczenie ma ich ustawienie w strukturze białka, to jakie oddziaływania mogą zachodzić pomiędzy poszczególnymi aminokwasami. Na początku

skupiano się na sekwencji aa i porównywano białka mezofilne z termofilnymi, czy hipertermofilnymi. Sprawdzano też strukturę białka, jego wielkość, ilość oraz długość pętli. W białkach termofilnych wskazuje się na ograniczoną dynamikę strukturalną oraz bogactwo reszt, które mogą wprowadzić wiele oddziaływań stabilizujących w określonych regionach^{96,164,97}. Dlatego wskazuje się na istotną rolę aminokwasów aromatycznych, reszt naładowanych i tych, które mogą ograniczyć dynamikę konformacyjną, jak proliny. Niektóre aminokwasy są uważane za termolabilne. Nie oznacza to jednak, że w ogóle nie będą występować w białkach termostabilnych, bo w niektórych regionach też będą pełnić istotną funkcję, np. na rzecz aktywności. Takie aminokwasy to przede wszystkim seryna i kwas asparaginowy¹⁵³. Można powiedzieć, że im białko bardziej przystosowane do niskich temperatur, tym bardziej nieuporządkowane (większa dynamika konformacyjna), a im bardziej przystosowana do temperatur wysokich, tym bardziej zwiększa się jego organizacja (niższa dynamika konformacyjna).

W pierwszej części pracy, starałam się pokazać, które aminokwasy są najbardziej istotne w stabilności termicznej endolizyny Ts2631. Szczególną uwagę przykuły tryptofany, duże aromatyczne aminokwasy, gdzie aż 3 z 7 pełniły istotną funkcję w stabilności termicznej białka. Co więcej, okazało się, że strukturalne homologi tego białka pochodzenia termofilnego, które tak jak endolizyna Ts2631 są amidazami typu 2, także posiadały w tym samym miejscu tryptofan, w przeciwieństwie do mezofilnych (innych eukariotycznych, bakteryjnych i wirusowych homologów strukturalnych), które w tym miejscu posiadały inny aminokwas (LysC było wyjątkiem, tam występowała fenyloalanina). Tryptofany, choć nie wszystkie, prawdopodobnie mają istotne znaczenie w stabilności termicznej białek termofilnych, które są amidazami typu 2. Reszty te znajdują się blisko C-końca białka, więc możliwe, że ich umiejscowienie także ma duże znaczenie.

Poza tym, że niektóre aa mają znaczenie w stabilności termicznej białka, to także jon Zn^{2+} stanowi istotny aspekt stabilności termicznej. Zaburzenie koordynacji tego jonu skutkuje obniżeniem T_m nawet o około 20°C. Jest to tylko potwierdzenie już wcześniej opisywanych założeń, gdzie wskazuje się na to, że obecność jonów metali wpływa na stabilność termiczną białek. Koordynacja takiego jonu wymaga zaangażowania kilku reszt, które są często zlokalizowane na różnych przeciwległych strukturach II- i III-rzędowych. Taka ilość oraz typ wiązań może obniżać dynamikę konformacyjną takiego układu podnosząc stabilność termodynamiczną białka²²⁶.

Co ciekawe uważa się, że także proliny i argininy pełnią istotną rolę w stabilności termicznej^{96,97}, ale ich pojedyncze zmiany w przypadku endolizyny Ts2631 nie mają znaczenia. Jedynie wariant P140A wykazał obniżoną stabilność termiczną. P140 znajduje się blisko centrum aktywnego i wiązania Zn^{2+} , więc substytucja proliny alaniną mogła zaburzyć koordynację jonu, a tym samym wpłynąć na stabilność kinetyczną, jak i termodynamiczną białka. W endolizynie Ts2631 znajduje się 13 prolin i 14 arginin, dlatego brak gwałtownego spadku stabilności białka był na początku niemałym zaskoczeniem. Możliwe, że zamiana kilku prolin, bądź arginin na alaninę mogłaby pokazać ich istotność.

Na podstawie wyników, jakie otrzymałam badając endolizynę Ts2631 wywnioskowałam, że reszty W102, W109, W145 i P140 to aminokwasy, które są głównie odpowiedzialne za utrzymanie stabilności termicznej w endolizynie Ts2631. Chciałam zweryfikować, czy uda się zwiększyć stabilność termiczną białek o pochodzeniu mezofilnym bazując tylko na podstawieniu aminokwasów po porównaniu sekwencji białek ze sobą. Warunkiem było znalezienie strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 oraz nie zaburzenie aktywności litycznej białek. Częściowo udało mi się potwierdzić, że istnieje możliwość podniesienia T_m białek mezofilnych przy takim podejściu, ale wymaga ono kilku poprawek.

W przypadku endolizyny K11gp3.5, gdzie utworzyłam wariant K11gp3.5-N91W_Q137W prawdopodobnie doszło do zaburzenia stabilności α -helisy w miejscu, gdzie glutamina została zastąpiona tryptofanem. W efekcie tej zamiany doszło do obniżenia T_m w porównaniu do białka typu dzikiego. Zmiana aminokwasu we właściwym miejscu może pozytywnie wpłynąć na stabilność termiczną białka. Pokazałam to na przykładzie domeny amidazowej białka LytO, gdzie zwiększyłam T_m białka o niemal 10°C. W wariancie Q115W_F179W zostało spełnionych kilka istotnych warunków.

Po pierwsze nie można brać pod uwagę reszt istotnych z punktu widzenia aktywności białka, czy reszt konserwowanych. Ich zamiana może przynieść odwrotny skutek i nawet obniżyć T_m oraz zaburzyć jego aktywność. Po drugie aa musi mieć w swoim otoczeniu partnera do interakcji. Bez tego zmiana aminokwasu na inny nie przyniesie żadnych korzyści. Po trzecie, nawet jeśli interakcja może zachodzić, to trzeba przyjrzeć się temu, czy w danym miejscu może on przynieść pozytywny efekt. Wprowadzenie aa do pętli, która znajduje się blisko centrum katalitycznego może wpłynąć na zachwianie dynamiki konformacyjnej, jaka potrzebna jest dla aktywności białka.

Badania nad pozostałymi białkami pozwoliły na określenie ich właściwości i użyteczności. Duże nadzieje wiążę z białkiem Lyc2, gdyż jego szerokie spektrum działania sprawia, iż jest potencjalnym narzędziem do walki z patogenami bakteryjnymi i z pewnością będzie obiektem kolejnych analiz.

Powyższe badania są rozwinięciem zrozumienia tego, jak można zaprogramować w białkach stabilność termiczną zachowując ich aktywność lityczną. Nie bez znaczenia jest tu analiza bioinformatyczna, która pomaga w szybszym i lepszym zrozumieniu układu białek, a rozwój technologii może przyspieszyć realizację badań. Jednak do tego, by narzędzia pomogły nam w pracy, najpierw potrzebna jest duża ilość danych eksperymentalnych, także tych negatywnych, które są jeszcze przed nami do uzyskania. Wydaje się, że porównywanie ze sobą strukturalnych homologów, to dobra metoda na to, by analizować między sobą białka, ale wymaga dogłębnej analizy struktury i oddziaływań zachodzących w białku, aby móc efektywnie wpłynąć na podniesienie stabilności białek.

7. Literatura

1. Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M. & Aatif, M. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals* **16**, 1615 (2023).
2. Sharp, R. Bacteriophages: biology and history. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 667–672 (2001).
3. Jesudason, T. WHO publishes updated list of bacterial priority pathogens. *Lancet Microbe* **5**, (2024).
4. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **74**, 229–263 (2024).
5. Haidar, G. *et al.* Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime-Avibactam and Imipenem-Relebactam against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, 10.1128/aac.00642-17 (2017).

6. Rogers, T. M. *et al.* Impact of ompk36 genotype and KPC subtype on the in vitro activity of ceftazidime/avibactam, imipenem/relebactam and meropenem/vaborbactam against KPC-producing *K. pneumoniae* clinical isolates. *JAC-Antimicrob. Resist.* **5**, dlad022 (2023).
7. Prajapati, J. D., Kleinekathöfer, U. & Winterhalter, M. How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics. *Chem. Rev.* **121**, 5158–5192 (2021).
8. Santajit, S. & Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Res. Int.* **2016**, 2475067 (2016).
9. De Oliveira, D. M. P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, 10.1128/cmr.00181-19 (2020).
10. Munita, J. M. & Arias, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. in *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* 481–511 (John Wiley & Sons, Ltd, 2016). doi:10.1128/9781555819286.ch17.
11. Ambler, R. P. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **289**, 321–331 (1997).
12. Paul D. Stapleton, Peter W. Taylor. Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Mechanisms and Modulation - (2002). <https://journals.sagepub.com/doi/10.3184/003685002783238870>.
13. Darby, E. M. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 280–295 (2023).
14. Liu, H. Y., Prentice, E. L. & Webber, M. A. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *Npj Antimicrob. Resist.* **2**, 27 (2024).
15. Kunnath, A. P., Suodha Suodh, M., Chellappan, D. K., Chellian, J. & Palaniveloo, K. Bacterial Persister Cells and Development of Antibiotic Resistance in Chronic Infections: An Update. *Br. J. Biomed. Sci.* **81**, 12958 (2024).

16. Azeem, K. *et al.* Biochemistry of Bacterial Biofilm: Insights into Antibiotic Resistance Mechanisms and Therapeutic Intervention. *Life* **15**, 49 (2025).
17. Mutuku, C., Gazdag, Z. & Melegh, S. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance genes in wastewater: resistance mechanisms and antimicrobial resistance control approaches. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 152 (2022).
18. Lomba, L. *et al.* Deep Eutectic Solvents: Are They Safe? *Appl. Sci.* **11**, 10061 (2021).
19. Kocot, A. M. *et al.* Deep eutectic solvent enhances antibacterial activity of a modular lytic enzyme against *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **15**, 2047 (2025).
20. Swebocki, T. *et al.* Breaking through Microbial Defenses—Organic Acid-Based Deep Eutectic Solvents as a Neoteric Strategy in Bacterial Biofilms, Persister, and Fungal Control. *ACS Appl. Bio Mater.* **8**, 8980–8990 (2025).
21. Zaib, Q., J. Eckelman, M., Yang, Y. & Kyung, D. Are deep eutectic solvents really green?: A life-cycle perspective. *Green Chem.* **24**, 7924–7930 (2022).
22. El Achkar, T., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ. Chem. Lett.* **19**, 3397–3408 (2021).
23. Tarín-Pelló, A., Suay-García, B. & Pérez-Gracia, M.-T. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **20**, 1095–1108 (2022).
24. Pavithra, G. & Rajasekaran, R. Gramicidin Peptide to Combat Antibiotic Resistance: A Review. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **26**, 191–199 (2020).
25. Szadkowska, M. *et al.* Molecular characterization of the PhiKo endolysin from *Thermus thermophilus* HB27 bacteriophage phiKo and its cryptic lytic peptide RAP-29. *Front. Microbiol.* **14**, (2024).
26. Torres, M. D. T. *et al.* Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. *Nat. Biomed. Eng.* **6**, 67–75 (2022).

27. Pidwill, G. R., Gibson, J. F., Cole, J., Renshaw, S. A. & Foster, S. J. The Role of Macrophages in *Staphylococcus aureus* Infection. *Front. Immunol.* **11**, (2021).
28. Strzelecki, P. *et al.* Trans-Cinnamaldehyde-Driven Silver Nanoparticles: Dual Role in Targeting Biofilm Disruption and Control of Biofilm-Forming Pathogens via Impairing Ferrous Ion Uptake. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **18**, 387–403 (2025).
29. Alqahtani, F. A., Almustafa, H. I., Alshehri, R. S., Alanazi, S. O. & Khalifa, A. Y. Combating Antibiotic Resistance in Bacteria: The Development of Novel Therapeutic Strategies. *J. Pure Appl. Microbiol.* **16**, 2201–2224 (2022).
30. Weber, M. *et al.* Successful Reduction of SARS-CoV-2 Viral Load by Photodynamic Therapy (PDT) Verified by QPCR – A Novel Approach in Treating Patients in Early Infection Stages. *Med. Clin. Res.* **2**, (2020).
31. Rusu, E. *et al.* Prebiotics and probiotics in atopic dermatitis (Review). *Exp. Ther. Med.* **18**, 926–931 (2019).
32. Wei, K. *et al.* Efficacy of probiotic supplementation in the treatment of psoriasis—A systematic review and meta-analysis. *J. Cosmet. Dermatol.* **23**, 2361–2367 (2024).
33. Fekete, M. *et al.* Exploring the Influence of Gut–Brain Axis Modulation on Cognitive Health: A Comprehensive Review of Prebiotics, Probiotics, and Symbiotics. *Nutrients* **16**, 789 (2024).
34. Papalini, S. *et al.* Stress matters: Randomized controlled trial on the effect of probiotics on neurocognition. *Neurobiol. Stress* **10**, 100141 (2019).
35. Shen, S. *et al.* *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactiplantibacillus plantarum* Lp-115 inhibit *Helicobacter pylori* colonization and gastric inflammation in a murine model. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, (2023).
36. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 649–659 (2001).

37. Żaczek, M. *et al.* A Thorough Synthesis of Phage Therapy Unit Activity in Poland—Its History, Milestones and International Recognition. *Viruses* **14**, 1170 (2022).
38. Rodrigues, S. *et al.* P102 Phage therapy: a new era of healing. *J. Cyst. Fibros.* **24**, S98 (2025).
39. Yang, Q., Le, S., Zhu, T. & Wu, N. Regulations of phage therapy across the world. *Front. Microbiol.* **14**, (2023).
40. Gangwar, M. *et al.* Immunological and safety profile of bacteriophage therapy: A pre-clinical study. *J. Appl. Microbiol.* **133**, 1446–1460 (2022).
41. Grabowski, Ł. *et al.* Sex-dependent differences in behavioral and immunological responses to antibiotic and bacteriophage administration in mice. *Front. Immunol.* **14**, (2023).
42. Ferry, T. *et al.* Personalized bacteriophage therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nat. Commun.* **13**, 4239 (2022).
43. Islam, M. M., Mahbub, N. U., Shin, W. S. & Oh, M. H. Phage-encoded depolymerases as a strategy for combating multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **14**, (2024).
44. Maciejewska, B. *et al.* Klebsiella phage KP34gp57 capsular depolymerase structure and function: from a serendipitous finding to the design of active mini-enzymes against *K. pneumoniae*. *mBio* **14**, e01329-23 (2023).
45. Khan, F. M., Rasheed, F., Yang, Y., Liu, B. & Zhang, R. Endolysins: a new antimicrobial agent against antimicrobial resistance. Strategies and opportunities in overcoming the challenges of endolysins against Gram-negative bacteria. *Front. Pharmacol.* **15**, (2024).
46. Alvarez, L. *et al.* Control of bacterial cell wall autolysins by peptidoglycan crosslinking mode. *Nat. Commun.* **15**, 7937 (2024).
47. Dehbanipour, R. & Ghalavand, Z. Anti-virulence therapeutic strategies against bacterial infections: recent advances. *Germes* **12**, 262–275 (2022).

48. Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A. & Pina-Vaz, C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms* **8**, 1716 (2020).
49. Sadowy, E. Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their dissemination in enterococci and streptococci. *Plasmid* **99**, 89–98 (2018).
50. Ager, S. & Gould, K. Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Infect. Drug Resist.* **5**, 87–102 (2012).
51. Boulaamane, Y. *et al.* Antibiotic discovery with artificial intelligence for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infections. *mSystems* **9**, e00325-24 (2024).
52. Zhang, L. *et al.* Demethoxycurcumin, a natural derivative of curcumin attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF- κ B signaling pathways in N9 microglia induced by lipopolysaccharide. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 331–338 (2010).
53. Rohde, M. The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol. Spectr.* **7**, 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044–2018 (2019).
54. Beveridge, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733 (1999).
55. Pazos, M. & Peters, K. Peptidoglycan. in *Bacterial Cell Walls and Membranes* (ed. Kuhn, A.) 127–168 (Springer International Publishing, Cham, 2019). doi:10.1007/978-3-030-18768-2_5.
56. Nelson, D., Loomis, L. & Fischetti, V. A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4107–4112 (2001).
57. Danis-Wlodarczyk, K. M., Wozniak, D. J. & Abedon, S. T. Treating Bacterial Infections with Bacteriophage-Based Enzybiotics: In Vitro, In Vivo and Clinical Application. *Antibiotics* **10**, 1497 (2021).

58. Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., Rodríguez, A. & García, P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Crit. Rev. Microbiol.* **39**, 427–434 (2013).
59. Majkowska-Skrobek, G. *et al.* Capsule-Targeting Depolymerase, Derived from Klebsiella KP36 Phage, as a Tool for the Development of Anti-Virulent Strategy. *Viruses* **8**, 324 (2016).
60. Pestrak, M. J. *et al.* Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* Glycoside Hydrolase PslG Combats Wound Infection by Improving Antibiotic Efficacy and Host Innate Immune Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 10.1128/aac.00234-19 (2019).
61. García, E. Structure, Function, and Regulation of LytA: The N-Acetylmuramoyl-l-alanine Amidase Driving the “Suicidal Tendencies” of *Streptococcus pneumoniae*—A Review. *Microorganisms* **13**, 827 (2025).
62. Zhao, J. *et al.* A novel of new class II bacteriocin from *Bacillus velezensis* HN-Q-8 and its antibacterial activity on *Streptomyces scabies*. *Front. Microbiol.* **13**, (2022).
63. Oliver, W. T. & Wells, J. E. Lysozyme as an alternative to growth promoting antibiotics in swine production. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **6**, 35 (2015).
64. Jacob, F. & Fuerst, C. R. The Mechanism of Lysis by Phage Studied with Defective Lysogenic Bacteria. *Microbiology* **18**, 518–526 (1958).
65. Grabowski, Ł. *et al.* Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents. *Microbiol. Res.* **248**, 126746 (2021).
66. Plotka, M. *et al.* Novel Highly Thermostable Endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 Bacteriophage Ph2119 with Amino Acid Sequence Similarity to Eukaryotic Peptidoglycan Recognition Proteins | *Appl Environ Microbiol.* **80**, <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.03074-13> (2014).

67. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G. & Maciejewska, B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1757–1773 (2015).
68. Gu, J. *et al.* Structural and Biochemical Characterization Reveals LysGH15 as an Unprecedented “EF-Hand-Like” Calcium-Binding Phage Lysin. *PLOS Pathog.* **10**, e1004109 (2014).
69. Nelson, D., Schuch, R., Chahales, P., Zhu, S. & Fischetti, V. A. PlyC: A multimeric bacteriophage lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 10765–10770 (2006).
70. McGowan, S. *et al.* X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12752–12757 (2012).
71. Briers, Y. *et al.* The high-affinity peptidoglycan binding domain of Pseudomonas phage endolysin KZ144. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **383**, 187–191 (2009).
72. Rajguru, V., Stuti Chatterjee, S., Garde, S & Reddy, M. Crosslink cleaving enzymes: the smart autolysins that remodel the bacterial cell wall. *Trends Microbiol.* **32**, 494–506 (2024).
73. Flores-Kim, J., Dobihal, G. S., Bernhardt, T. G. & Rudner, D. Z. WhyD tailors surface polymers to prevent premature bacteriolysis and direct cell elongation in *Streptococcus pneumoniae*. *eLife* **11**, e76392.
74. Izquierdo-Martinez, A. *et al.* DipM controls multiple autolysins and mediates a regulatory feedback loop promoting cell constriction in *Caulobacter crescentus*. *Nat. Commun.* **14**, 4095 (2023).
75. Brunskill, E. W. & Bayles, K. W. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 611–618 (1996).
76. Dahyot, S. *et al.* Role of the LytSR Two-Component Regulatory System in *Staphylococcus lugdunensis* Biofilm Formation and Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **11**, (2020).

77. Woods, E. C. & McBride, S. M. Regulation of antimicrobial resistance by extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Microbes Infect.* **19**, 238–248 (2017).
78. Osipovitch, D. C., Therrien, S. & Griswold, K. E. Discovery of novel *S. aureus* autolysins and molecular engineering to enhance bacteriolytic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 6315–6326 (2015).
79. Fowler, V. G. *et al.* Exebacase in Addition to Standard-of-Care Antibiotics for *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections and Right-Sided Infective Endocarditis: A Phase 3, Superiority-Design, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial (DISRUPT). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **78**, 1473–1481 (2024).
80. World Health Organization. Antibacterial Agents in Clinical Development (2017).
81. Rodríguez-Gascón, A., Solinís, M. Á. & Isla, A. The Role of PK/PD Analysis in the Development and Evaluation of Antimicrobials. *Pharmaceutics* **13**, 833 (2021).
82. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Antibacterial Therapies for Patients With an Unmet Medical Need for the Treatment of Serious Bacterial Diseases Guidance for Industry (2017).
83. European Medicines Agency. Guideline on the evaluation of medicinal products indicated for treatment of bacterial infections. *Nfe Ct Ons* (2022).
84. World Health Organization. Target product profiles for new antibacterial agents (2017).
85. Vieille, C. & Zeikus, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **65**, 1–43 (2001).
86. Saiki, R. K. *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).

87. Schenkel, M., Treff, A., Deber, C. M., Krainer, G. & Schlierf, M. Heat treatment of thioredoxin fusions increases the purity of α -helical transmembrane protein constructs. *Protein Sci.* **30**, 1974–1982 (2021).
88. Ashaolu, T. J., Malik, T., Soni, R., Prieto, M. A. & Jafari, S. M. Extremophilic Microorganisms as a Source of Emerging Enzymes for the Food Industry: A Review. *Food Sci. Nutr.* **13**, e4540 (2025).
89. Harrington, L. B. *et al.* A thermostable Cas9 with increased lifetime in human plasma. *Nat. Commun.* **8**, 1424 (2017).
90. Collier, A. M. *et al.* Lysosomal protein thermal stability does not correlate with cellular half-life: global observations and a case study of tripeptidyl-peptidase 1. *Biochem. J.* **477**, 727–745 (2020).
91. Seijsing, J. *et al.* Improved Biodistribution and Extended Serum Half-Life of a Bacteriophage Endolysin by Albumin Binding Domain Fusion. *Front. Microbiol.* **9**, 2927 (2018).
92. Jun, S. Y. *et al.* Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage Endolysin-Based Candidate Drug SAL200 after a Single Intravenous Administration among Healthy Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, 10.1128/aac.02629-16 (2017).
93. Jun, S. Y. *et al.* Pharmacokinetics of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 in monkeys and its appropriate intravenous dosing period. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **43**, 1013–1016 (2016).
94. Livesay, D. R. & Jacobs, D. J. Conserved quantitative stability/flexibility relationships (QSFR) in an orthologous RNase H pair. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **62**, 130–143 (2006).

95. Boutz, D. R., Cascio, D., Whitelegge, J., Perry, L. J. & Yeates, T. O. Discovery of a Thermophilic Protein Complex Stabilized by Topologically Interlinked Chains. *J. Mol. Biol.* **368**, 1332–1344 (2007).
96. Taylor, T. J. & Vaisman, I. I. Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. *BMC Struct. Biol.* **10**, S5 (2010).
97. Ahmed, Z., Zulfiqar, H., Tang, L. & Lin, H. A Statistical Analysis of the Sequence and Structure of Thermophilic and Non-Thermophilic Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10116 (2022).
98. Sujak, A., Sanghamitra, N. J. M., Maneg, O., Ludwig, B. & Mazumdar, S. Thermostability of Proteins: Role of Metal Binding and pH on the Stability of the Dinuclear CuA Site of *Thermus thermophilus*. *Biophys. J.* **93**, 2845–2851 (2007).
99. Ji, S. *et al.* A novel 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase: Magnesium ion significantly enhances its activity and thermostability. *Int. J. Biol. Macromol.* **177**, 111–118 (2021).
100. Pham, T. L. *et al.* Relationship of Thermostability and Binding Affinity in Metal-binding WW-Domain Minireceptors. *ChemBioChem* **25**, e202300715 (2024).
101. Jónsdóttir, L. B. *et al.* The role of salt bridges on the temperature adaptation of aqualysin I, a thermostable subtilisin-like proteinase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1844**, 2174–2181 (2014).
102. Robles-Arias, M. A. *et al.* Effect of temperature on the structure of α -l-fucosidase from *Thermotoga maritima*: implications from molecular dynamics simulation. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **0**, 1–15.
103. Kumar, R., Srivastava, V., Baidara, P. & Ahmad, A. Thermostable vaccines: an innovative concept in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* **21**, 811–824 (2022).

104. Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. & Antranikian, G. Extremozymes — biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 116–123 (2014).
105. Plotka, M. *et al.* Biochemical Characterization and Validation of a Catalytic Site of a Highly Thermostable Ts2631 Endolysin from the *Thermus scotoductus* Phage vB_Tsc2631. *PLoS ONE* **10**, e0137374 (2015).
106. Cho, S. *et al.* Structural insights into the bactericidal mechanism of human peptidoglycan recognition proteins *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104** (21), 8761-8766 PNAS. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0701453104> (2007).
107. Plotka, M. *et al.* Structure and function of the Ts2631 endolysin of *Thermus scotoductus* phage vB_Tsc2631 with unique N-terminal extension used for peptidoglycan binding. *Sci. Rep.* **9**, 1261 (2019).
108. van Kempen, M. *et al.* Fast and accurate protein structure search with Foldseek. *Nat. Biotechnol.* **42**, 243–246 (2024).
109. Heo, L., Park, H. & Seok, C. GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res.* **41**, W384–W388 (2013).
110. Hekkelman, M. L., de Vries, I., Joosten, R. P. & Perrakis, A. AlphaFill: enriching AlphaFold models with ligands and cofactors. *Nat. Methods* **20**, 205–213 (2023).
111. Holm, L., Laiho, A., Törönen, P., & Salgado, M. DALI shines a light on remote homologs: One hundred discoveries. *Protein Science - Wiley* **32**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.4519> (2022)
112. pSSdb - Protein Secondary Structure Database. <https://pssdb.mimuw.edu.pl/statistics.html>.
113. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).

114. Zhou, Y., Pan, Q., Pires, D. E. V., Rodrigues, C. H. M. & Ascher, D. B. DDMut: predicting effects of mutations on protein stability using deep learning. *Nucleic Acids Res.* **51**, W122–W128 (2023).
115. Montanucci, L., Capriotti, E., Frank, Y., Ben-Tal, N. & Fariselli, P. DDGun: an untrained method for the prediction of protein stability changes upon single and multiple point variations. *BMC Bioinformatics* **20**, 335 (2019).
116. Pires, D. E. V., Ascher, D. B. & Blundell, T. L. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* **30**, 335–342 (2014).
117. Rodrigues, C. H. M., Pires, D. E. V. & Ascher, D. B. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **30**, 60–69 (2021).
118. Capriotti, E., Fariselli, P. & Casadio, R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* **33**, W306–W310 (2005).
119. Cheng, J., Randall, A. & Baldi, P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **62**, 1125–1132 (2006).
120. Lin, Z. *et al.* Evolutionary-scale prediction of atomic-level protein structure with a language model. *Science* **379**, 1123–1130 (2023).
121. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
122. Wu, R. *et al.* High-resolution de novo structure prediction from primary sequence. 2022.07.21.500999 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2022.07.21.500999> (2022).
123. Baek, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* **373**, 871–876 (2021).

124. Chowdhury, R. *et al.* Single-sequence protein structure prediction using a language model and deep learning. *Nat. Biotechnol.* **40**, 1617–1623 (2022).
125. Pearce, R., Li, Y., Omenn, G. S. & Zhang, Y. Fast and accurate Ab Initio Protein structure prediction using deep learning potentials. *PLOS Comput. Biol.* **18**, e1010539 (2022).
126. Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. & Sternberg, M. J. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**, 845–858 (2015).
127. Webb, B. & Sali, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **54**, 5.6.1-5.6.37 (2016).
128. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**, 493–500 (2024).
129. Protenix Server. <http://101.126.11.40:8000/add-prediction>.
130. Discovery, C. *et al.* Chai-1: Decoding the molecular interactions of life. 2024.10.10.615955 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2024.10.10.615955> (2024).
131. Husnik, F. & McCutcheon, J. P. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 67–79 (2018).
132. Plotka, M. *et al.* Molecular Characterization of a Novel Lytic Enzyme LysC from *Clostridium intestinale* URNW and Its Antibacterial Activity Mediated by Positively Charged N-Terminal Extension. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4894 (2020).
133. Heineman, R. H., Bull, J. J. & Molineux, I. J. Layers of Evolvability in a Bacteriophage Life History Trait. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1289–1298 (2009).
134. Pezeshgi Modarres, H., R. Mofrad, M. & Sanati-Nezhad, A. Protein thermostability engineering. *RSC Adv.* **6**, 115252–115270 (2016).
135. Carugo, O. B-factor accuracy in protein crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **78**, 69–74 (2022).

136. Pandey, A., Liu, E., Graham, J., Chen, W. & Keten, S. B-factor prediction in proteins using a sequence-based deep learning model. *Patterns* **4**, 100805 (2023).
137. De Simone, G. *et al.* A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase1. *J. Mol. Biol.* **303**, 761–771 (2000).
138. Kovacic, F. *et al.* Structural features determining thermal adaptation of estrases: *Protein Engineering, Design and Selection. Ovid* **29(2)**:p 65-76
<https://www.ovid.com/journals/pedas/fulltext/10.1093/protein/gzv061~structural-features-determining-thermal-adaptation-of> (2016).
139. Rahban, M. *et al.* Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **214**, 642–654 (2022).
140. Barik, S. The Uniqueness of Tryptophan in Biology: Properties, Metabolism, Interactions and Localization in Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8776 (2020).
141. Szczygiel, M., Derewenda, U., Scheiner, S., Minor, W. & Derewenda, Z. S. A structural role for tryptophan in proteins, and the ubiquitous Trp C δ 1—H \cdots O=C (backbone) hydrogen bond. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **80**, 551–562 (2024).
142. Carlsson, A.-C. C. *et al.* Increasing Enzyme Stability and Activity through Hydrogen Bond-Enhanced Halogen Bonds. *Biochemistry* **57**, 4135–4147 (2018).
143. Zhang, S., Rodriguez, L. M. D. L., Li, F. F. & Brimble, M. A. Recent developments in the cleavage, functionalization, and conjugation of proteins and peptides at tyrosine residues. *Chem. Sci.* **14**, 7782–7817 (2023).
144. Calinsky, R. & Levy, Y. Histidine in Proteins: pH-Dependent Interplay between π - π , Cation- π , and CH- π Interactions. *J. Chem. Theory Comput.* **20**, 6930–6945 (2024).

145. Sælensminde, G., Halskau, Ø. & Jonassen, I. Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role. *Extremophiles* **13**, 11–20 (2009).
146. Hogues, H., Wei, W. & Sulea, T. Improved Structure-Based Histidine pKa Prediction for pH-Responsive Protein Design. *J. Chem. Inf. Model.* **65**, 1560–1569 (2025).
147. Fitch, C. A., Platzer, G., Okon, M., Garcia-Moreno E., B. & McIntosh, L. P. Arginine: Its p K_a value revisited. *Protein Sci.* **24**, 752–761 (2015).
148. Grimsley, G. R., Scholtz, J. M. & Pace, C. N. A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **18**, 247–251 (2009).
149. Isom, D. G., Castañeda, C. A., Cannon, B. R. & García-Moreno E., B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5260–5265 (2011).
150. Berezovsky, I. N., Chen, W. W., Choi, P. J. & Shakhnovich, E. I. Entropic Stabilization of Proteins and Its Proteomic Consequences. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e47 (2005).
151. Calinsky, R. & Levy, Y. Aromatic Residues in Proteins: Re-Evaluating the Geometry and Energetics of π – π , Cation– π , and CH– π Interactions. *J. Phys. Chem. B* **128**, 8687–8700 (2024).
152. Khan, M. F. & Patra, S. Deciphering the rationale behind specific codon usage pattern in extremophiles. *Sci. Rep.* **8**, 15548 (2018).
153. Uversky, V. N. The intrinsic disorder alphabet. III. Dual personality of serine. *Intrinsically Disord. Proteins* **3**, e1027032 (2015).
154. Kruglikov, A. & Xia, X. Mesophiles vs. Thermophiles: Untangling the Hot Mess of Intrinsically Disordered Proteins and Growth Temperature of Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, 2000 (2024).

155. Peng, Z. *et al.* Exceptionally abundant exceptions: comprehensive characterization of intrinsic disorder in all domains of life. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 137–151 (2015).
156. Hazra, M. K., Gilron, Y. & Levy, Y. Not Only Expansion: Proline Content and Density Also Induce Disordered Protein Conformation Compaction. *J. Mol. Biol.* **435**, 168196 (2023).
157. Alblooshi, A. S., Nasar, M. I., Rehman, S. S. U. & Alam, M. T. Genomic and metabolic network properties in thermophiles and psychrophiles compared to mesophiles. *Sci. Rep.* **15**, 19757 (2025).
158. Smith, C. A., Toogood, H. S., Baker, H. M., Daniel, R. M. & Baker, E. N. Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus Ak.1* protease at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **294**, 1027–1040 (1999).
159. Karlin, S. & Zhu, Z.-Y. Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14231–14236 (1997).
160. Kluska, K., Chorążewska, A., Peris-Díaz, M. D., Adamczyk, J. & Krężel, A. Non-Conserved Amino Acid Residues Modulate the Thermodynamics of Zn(II) Binding to Classical $\beta\beta\alpha$ Zinc Finger Domains. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 14602 (2022).
161. Biancalana, M., Makabe, K., Koide, A. & Koide, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to the Surface of β -Rich Peptide Self-Assemblies. *J. Mol. Biol.* **385**, 1052–1063 (2009).
162. Joo, H. & Tsai, J. An Amino Acid Code for β -sheet Packing Structure. *Proteins* **82**, 2128–2140 (2014).
163. Yang, Z., Xia, Z., Huynh, T., King, J. A. & Zhou, R. Dissecting the contributions of β -hairpin tyrosine pair to the folding and stability of long-lived human γ D-crystallins. *Nanoscale* **6**, 1797–1807 (2014).

164. Tych, K. M. *et al.* Differential Effects of Hydrophobic Core Packing Residues for Thermodynamic and Mechanical Stability of a Hyperthermophilic Protein. *Langmuir* **32**, 7392–7402 (2016).
165. Xue, M. *et al.* How internal cavities destabilize a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 21031–21036 (2019).
166. Spassov, V. Z., Yan, L. & Flook, P. K. The dominant role of side-chain backbone interactions in structural realization of amino acid code. ChiRotor: A side-chain prediction algorithm based on side-chain backbone interactions. *Protein Sci.* **16**, 494–506 (2007).
167. Zeldovich, K. B., Chen, P. & Shakhnovich, E. I. Protein stability imposes limits on organism complexity and speed of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16152–16157 (2007).
168. Munson, M. *et al.* What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. *Protein Sci.* **5**, 1584–1593 (1996).
169. Pace, C. N. & Scholtz, J. M. A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophys. J.* **75**, 422–427 (1998).
170. Zou, J., Song, B., Simmerling, C. & Raleigh, D. Experimental and Computational Analysis of Protein Stabilization by Gly-to-D-Ala Substitution: A Convolution of Native State and Unfolded State Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 15682–15689 (2016).
171. Lyu, P. C., Sherman, J. C., Chen, A. & Kallenbach, N. R. Alpha-helix stabilization by natural and unnatural amino acids with alkyl side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5317–5320 (1991).
172. Li, C. *et al.* Conformational Flexibility of a Short Loop near the Active Site of the SARS-3CLpro is Essential to Maintain Catalytic Activity. *Sci. Rep.* **6**, 20918 (2016).

173. Truongvan, N., Jang, S.-H. & Lee, C. Flexibility and Stability Trade-Off in Active Site of Cold-Adapted *Pseudomonas mandelii* Esterase EstK. *Biochemistry* **55**, 3542–3549 (2016).
174. Yang, J. *et al.* Relation between the flexibility of the WPD loop and the activity of the catalytic domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Cell. Biochem.* **84**, 47–55 (2002).
175. J. Miles, A., W. Janes, R. & A. Wallace, B. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 8400–8413 (2021).
176. Brinda, K. V. & Vishveshwara, S. A Network Representation of Protein Structures: Implications for Protein Stability. *Biophys. J.* **89**, 4159–4170 (2005).
177. Souza, V. P., Ikegami, C. M., Arantes, G. M. & Marana, S. R. Mutations close to a hub residue affect the distant active site of a GH1 β -glucosidase. *PLOS ONE* **13**, e0198696 (2018).
178. Ban, X. *et al.* Evolutionary Stability of Salt Bridges Hints Its Contribution to Stability of Proteins. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **17**, 895–903 (2019).
179. Bandyopadhyay, A. K., Islam, R. N. U., Mitra, D., Banerjee, S. & Goswami, A. Stability of buried and networked salt-bridges (BNSB) in thermophilic proteins. *Bioinformatics* **15**, 61–67 (2019).
180. An, Y. J. *et al.* Improvement of FGF7 Thermal Stability by Introduction of Mutations in Close Vicinity to Disulfide Bond and Surface Salt Bridge. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **28**, 85 (2022).
181. Sharif, S., Singh, M., Kim, S. J. & Schaefer, J. *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan Tertiary Structure from Carbon-13 Spin Diffusion. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7023–7030 (2009).

182. Gumbart, J. C., Beeby, M., Jensen, G. J. & Roux, B. *Escherichia coli* Peptidoglycan Structure and Mechanics as Predicted by Atomic-Scale Simulations. *PLOS Comput. Biol.* **10**, e1003475 (2014).
183. Walmagh, M. *et al.* Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4369–4375 (2013).
184. Thomas, J. G. & Baneyx, F. Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli* Cells Overexpressing Heat-shock Proteins (*). *J. Biol. Chem.* **271**, 11141–11147 (1996).
185. Kim, C. & Lee, B. Accuracy of structure-based sequence alignment of automatic methods. *BMC Bioinformatics* **8**, 355 (2007).
186. Huang, Y. *et al.* Helix N-Cap Residues Drive the Acid Unfolding That Is Essential in the Action of the Toxin Colicin A. *Biochemistry* **58**, 4882–4892 (2019).
187. Beaufils, C., Man, H.-M., de Poulpiquet, A., Mazurenko, I. & Lojou, E. From Enzyme Stability to Enzymatic Bioelectrode Stabilization Processes. *Catalysts* **11**, 497 (2021).
188. Foster, S. Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4 | *Journal of Bacteriology* **177**, <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.177.19.5723-5725.1995>. (1995).
189. Ochiai, T. *Staphylococcus aureus* Produces Autolysin-Susceptible Cell Walls during Growth in a High-NaCl and Low-Ca²⁺ Concentration Medium. *Microbiol. Immunol.* **44**, 97–104 (2000).
190. Bera, A., Biswas, R., Herbert, S. & Götz, F. The Presence of Peptidoglycan O-Acetyltransferase in Various Staphylococcal Species Correlates with Lysozyme Resistance and Pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**, 4598–4604 (2006).
191. Schleifer, K. H. & Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477 (1972).

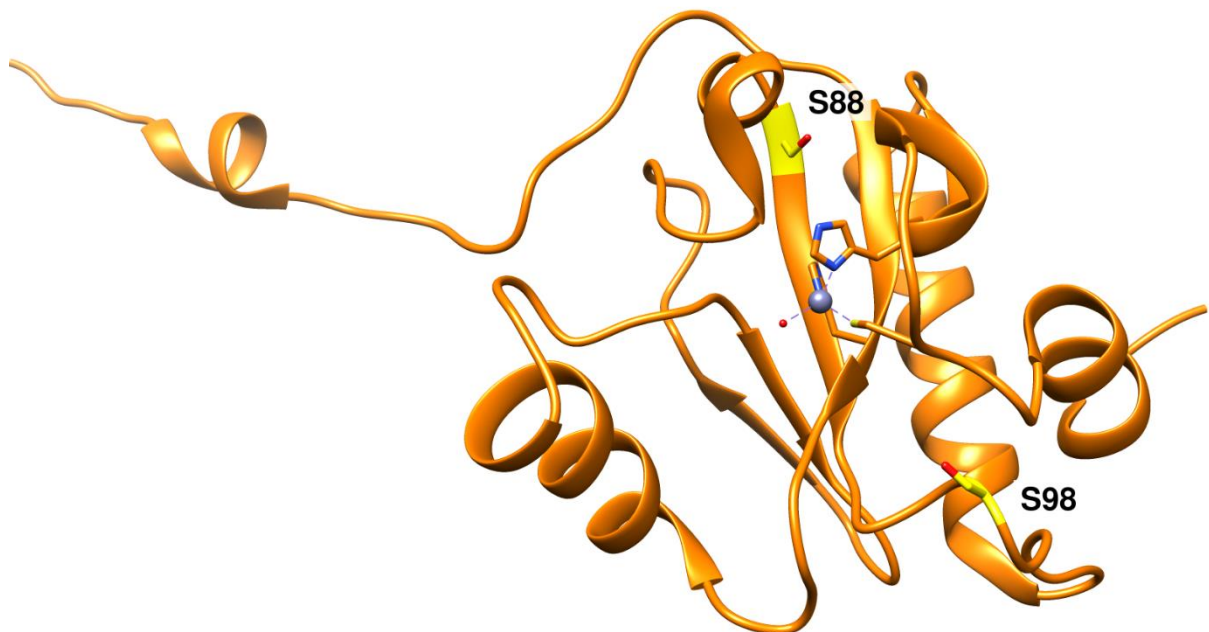
192. Pavani, P., Kumar, K., Rani, A., Venkatesu, P. & Lee, M.-J. The influence of sodium phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer interactions. *J. Mol. Liq.* **331**, 115753 (2021).
193. Madhusudan Makwana, K. & Mahalakshmi, R. Implications of aromatic–aromatic interactions: From protein structures to peptide models. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **24**, 1920–1933 (2015).
194. Lanzarotti, E., Defelipe, L. A., Marti, M. A. & Turjanski, A. G. Aromatic clusters in protein–protein and protein–drug complexes. *J. Cheminformatics* **12**, 30 (2020).
195. Domic, I. *et al.* Primary Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* in an Immunocompetent Host: Case Report and Literature Review. *Medicina (Mex.)* **58**, 488 (2022).
196. Bellinzoni, M. *et al.* Structural studies suggest a peptidoglycan hydrolase function for the *Mycobacterium tuberculosis* Tat-secreted protein Rv2525c. *J. Struct. Biol.* **188**, 156–164 (2014).
197. Tamai, E. *et al.* X-ray structure of a novel endolysin encoded by episomal phage phiSM101 of *Clostridium perfringens*. *Mol. Microbiol.* **92**, 326–337 (2014).
198. Büttner, F. M., Zoll, S., Nega, M., Götz, F. & Stehle, T. Structure-Function Analysis of *Staphylococcus aureus* Amidase Reveals the Determinants of Peptidoglycan Recognition and Cleavage *. *J. Biol. Chem.* **289**, 11083–11094 (2014).
199. Zoll, S. *et al.* Structural Basis of Cell Wall Cleavage by a Staphylococcal Autolysin. *PLOS Pathog.* **6**, e1000807 (2010).
200. Low, L. Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. & Liddington, R. C. Structure and Lytic Activity of a *Bacillus anthracis* Prophage Endolysin *. *J. Biol. Chem.* **280**, 35433–35439 (2005).

201. Wischral, D. *et al.* Production of 1,3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. *Bioresour. Technol.* **212**, 100–110 (2016).
202. Nogaroto, V. *et al.* Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 187–193 (2006).
203. Leite, N. R. *et al.* The crystal structure of the cysteine protease Xylellain from *Xylella fastidiosa* reveals an intriguing activation mechanism. *FEBS Lett.* **587**, 339–344 (2013).
204. Jílková, A. *et al.* Activation route of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: structural map with a glycosaminoglycan switch. *Struct. Lond. Engl. 1993* **22**, 1786–1798 (2014).
205. Mellroth, P. *et al.* Structural and Functional Insights into Peptidoglycan Access for the Lytic Amidase LytA of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* **5**, 10.1128/mbio.01120-13 (2014).
206. Figaj, D. The Role of Heat Shock Protein (Hsp) Chaperones in Environmental Stress Adaptation and Virulence of Plant Pathogenic Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **26**, 528 (2025).
207. Miroux, B. & Walker, J. E. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298 (1996).
208. Wagner, S. *et al.* Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 14371–14376 (2008).
209. Mthembu, S. N., Sharma, A., Albericio, F. & de la Torre, B. G. Breaking a Couple: Disulfide Reducing Agents. *ChemBioChem* **21**, 1947–1954 (2020).
210. Arakawa, T. & Tokunaga, M. Electrostatic and Hydrophobic Interactions Play A Major Role in the Stability and Refolding of Halophilic Proteins. *Protein Pept. Lett.* **11**, 125–132.

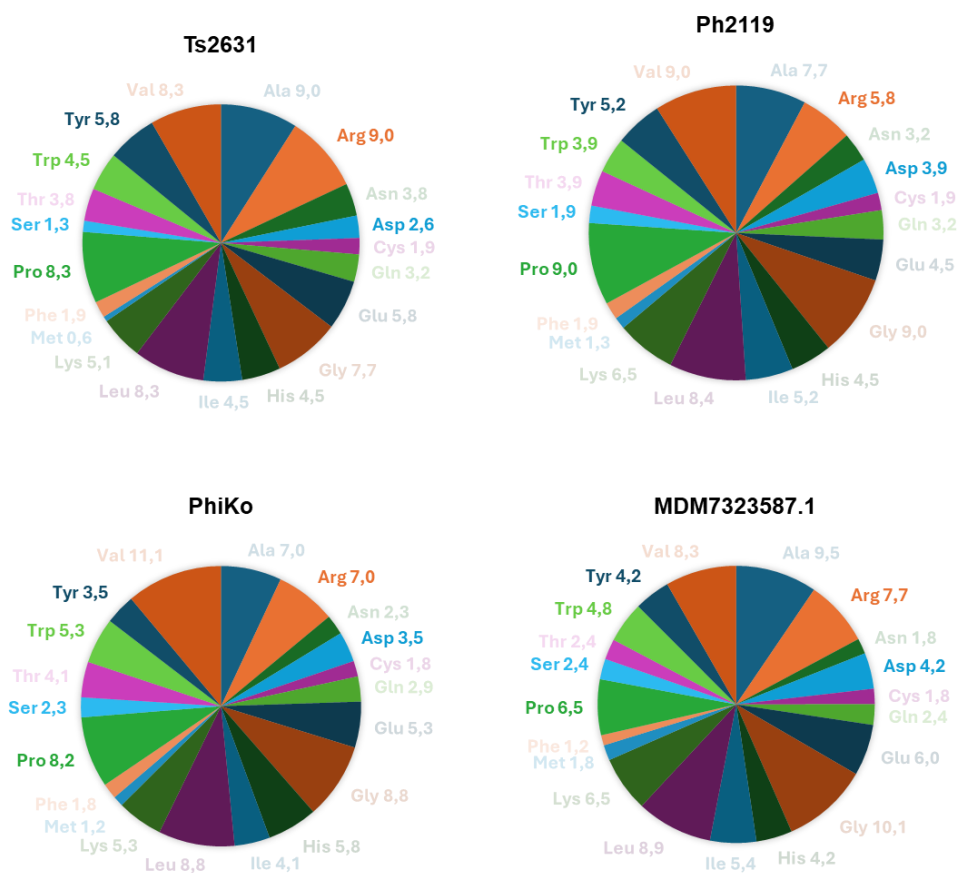
211. Sinha, R. & Khare, S. K. Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
212. Quintela, J., Caparrós, M. & de Pedro, M. A. Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 95–100 (1995).
213. Le, N.-H. *et al.* Peptidoglycan editing provides immunity to *Acinetobacter baumannii* during bacterial warfare. *Sci. Adv.* **6**, eabb5614 (2020).
214. Takumi, K. & Kawata, T. Quantitative Chemical Analyses and Antigenic Properties of Peptidoglycans from *Clostridium botulinum* and Other *Clostridia*. *Jpn. J. Microbiol.* **20**, 287–292 (1976).
215. Kreader, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1102–1106 (1996).
216. Nagai, M., Yoshida, A. & Sato, N. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on PCR. *IUBMB Life* **44**, 157–163 (1998).
217. Magnusson, A. O. *et al.* nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS J.* **286**, 184–204 (2019).
218. Kunz, P., Ortale, A., Mücke, N., Zinner, K. & Hoheisel, J. D. Nanobody stability engineering by employing the ΔT_m shift; a comparison with apparent rate constants of heat-induced aggregation. *Protein Eng. Des. Sel.* **32**, 241–249 (2019).
219. Tamburini, E., Daly, S., Steiner, U., Vandini, C. & Mastromei, G. *Clostridium felsineum* and *Clostridium acetobutylicum* are two distinct species that are phylogenetically closely related. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 963–966 (2001).
220. Hugonnet, J.-E. *et al.* Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *eLife* **5**, e19469 (2016).

221. Galley, N. F. *et al.* *Clostridioides difficile* canonical L,D-transpeptidases catalyze a novel type of peptidoglycan cross-links and are not required for beta-lactam resistance. *J. Biol. Chem.* **300**, 105529 (2024).
222. Anderson, E. M. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* Alters Peptidoglycan Composition under Nutrient Conditions Resembling Cystic Fibrosis Lung Infections. *mSystems* **7**, e00156-22 (2022).
223. Toth, M., Stewart, N. K., Smith, C. A., Lee, M. & Vakulenko, S. B. The l,d-Transpeptidase LdtAb from *Acinetobacter baumannii* Is Poorly Inhibited by Carbapenems and Has a Unique Structural Architecture. *ACS Infect. Dis.* **8**, 1948–1961 (2022).
224. Peltier, J. *et al.* *Clostridium difficile* Has an Original Peptidoglycan Structure with a High Level of N-Acetylglucosamine Deacetylation and Mainly 3-3 Cross-links *. *J. Biol. Chem.* **286**, 29053–29062 (2011).
225. Bornshort, J. A. & Falke J. J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. in *Methods in Enzymology* vol. 326 245–254 (Academic Press, 2000).
226. Rodzik, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G. N. & Buszewski, B. Interactions of Whey Proteins with Metal Ions. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2156 (2020).

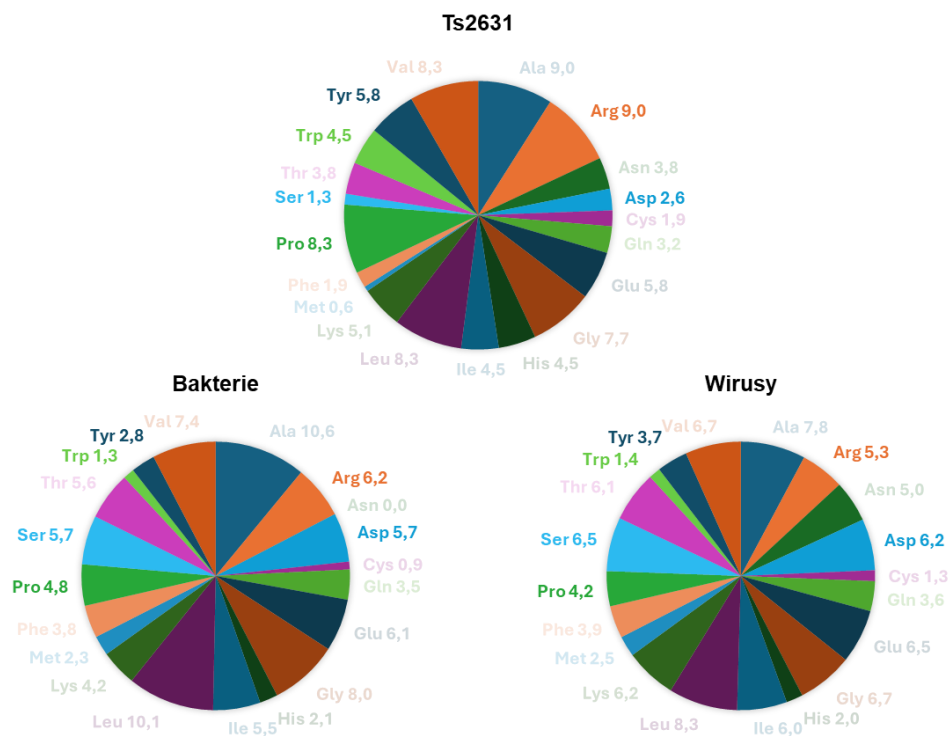
8. Supplement



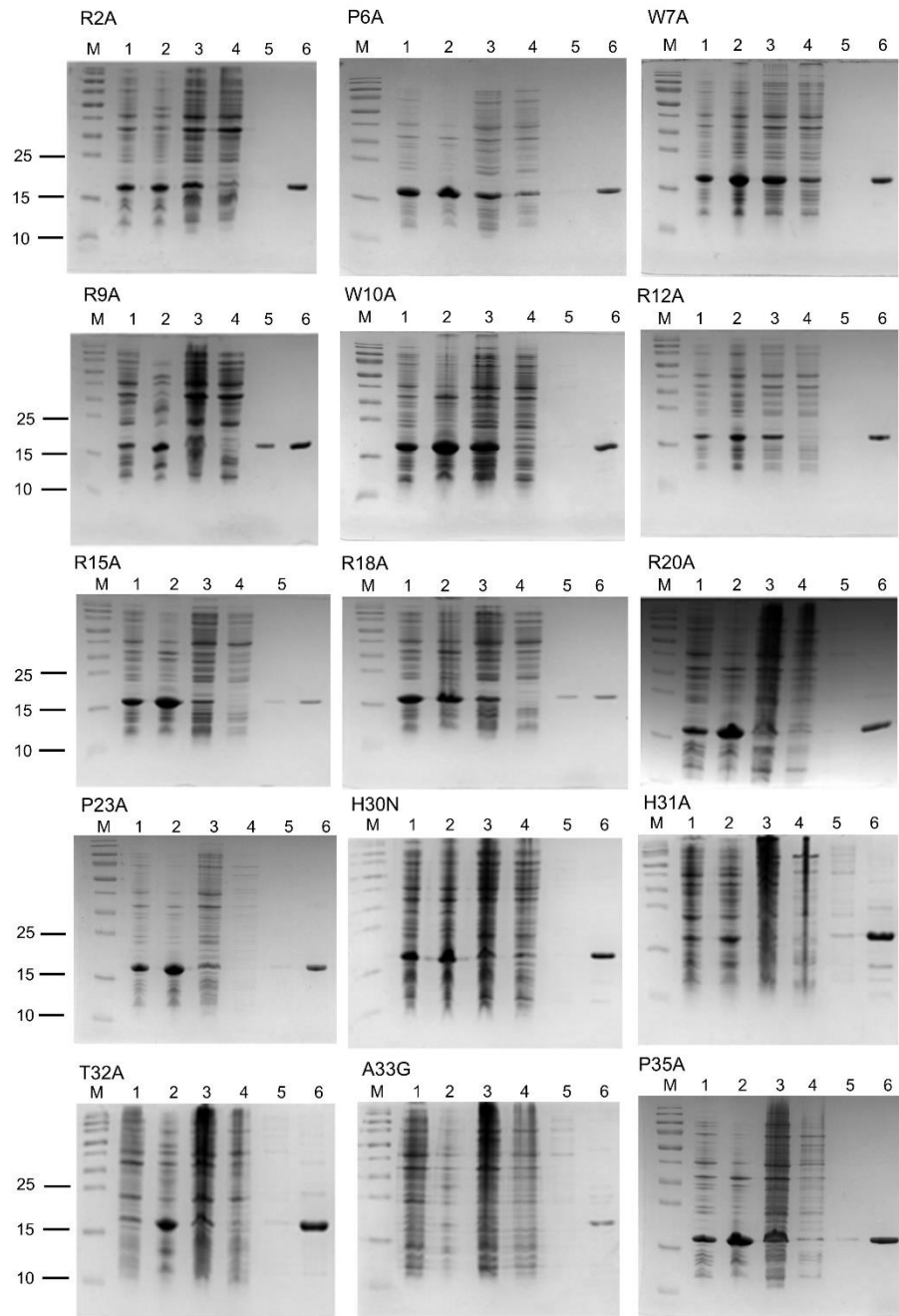
Ryc. S1. Struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG) z zaznaczonymi resztami seryny S88 i S98.

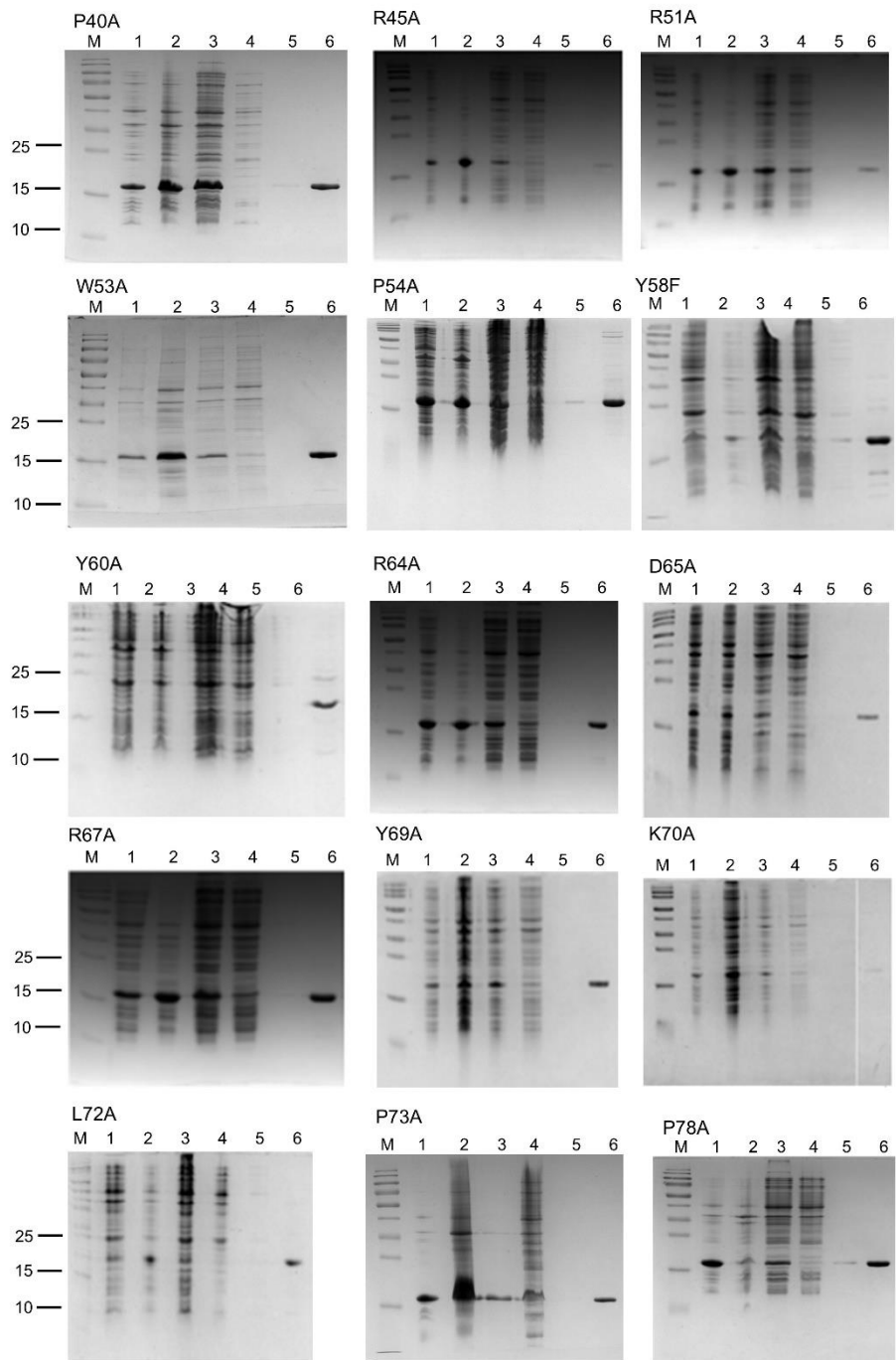


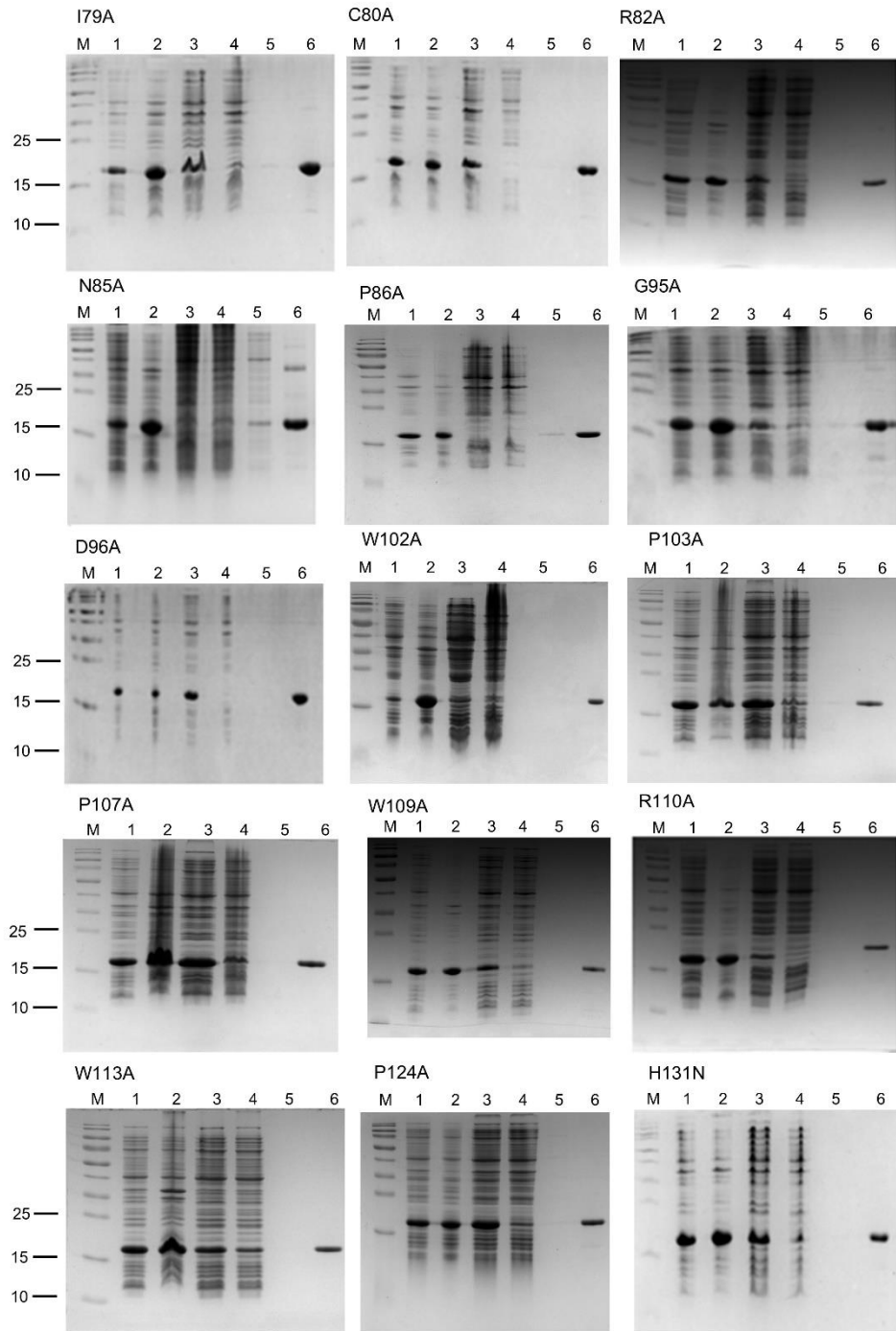
Ryc. S2. Rozkład aminokwasów w poszczególnych sekwencjach białek termofilnych.

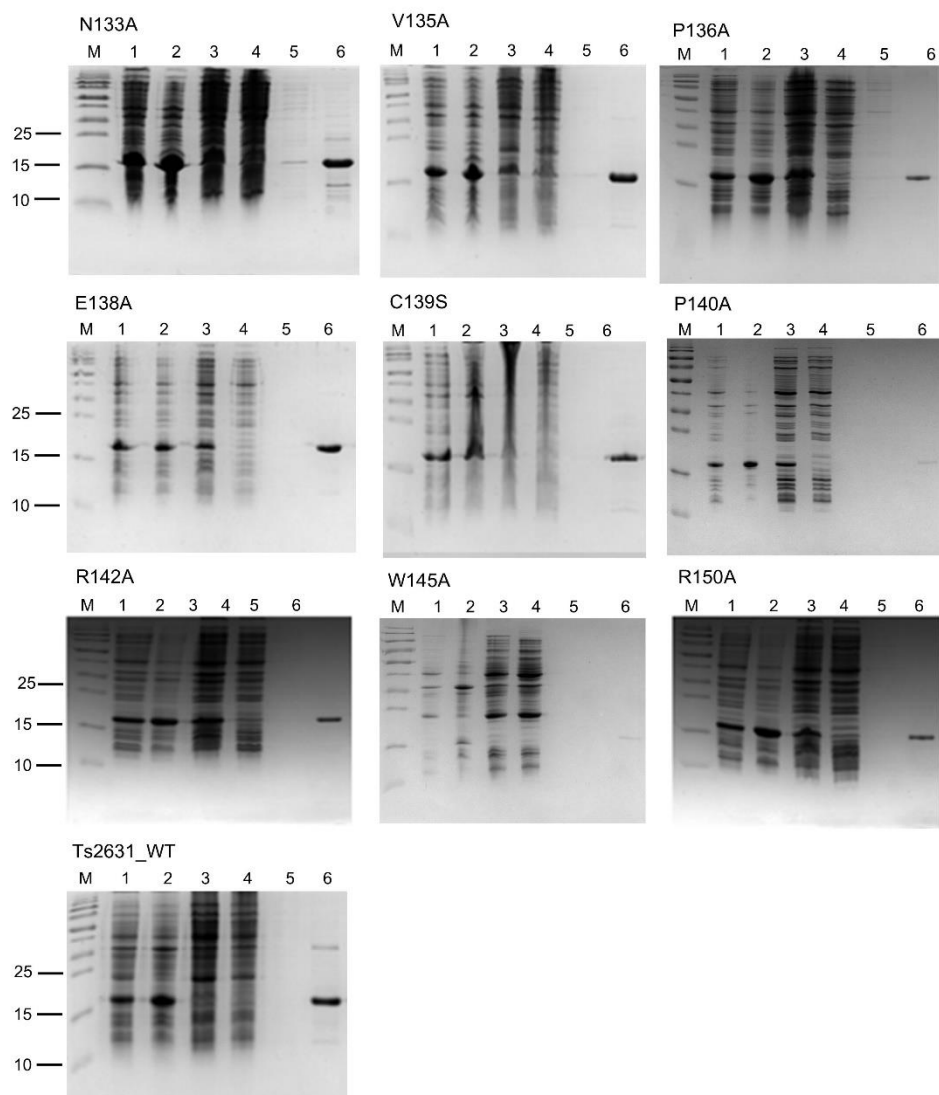


Ryc. S3. Przedstawienie rozkładu procentowego poszczególnych aminokwasów występujących w endolizynie Ts2631 oraz wirusach (518 140 białek) i bakteriach (30 290 647 białek).

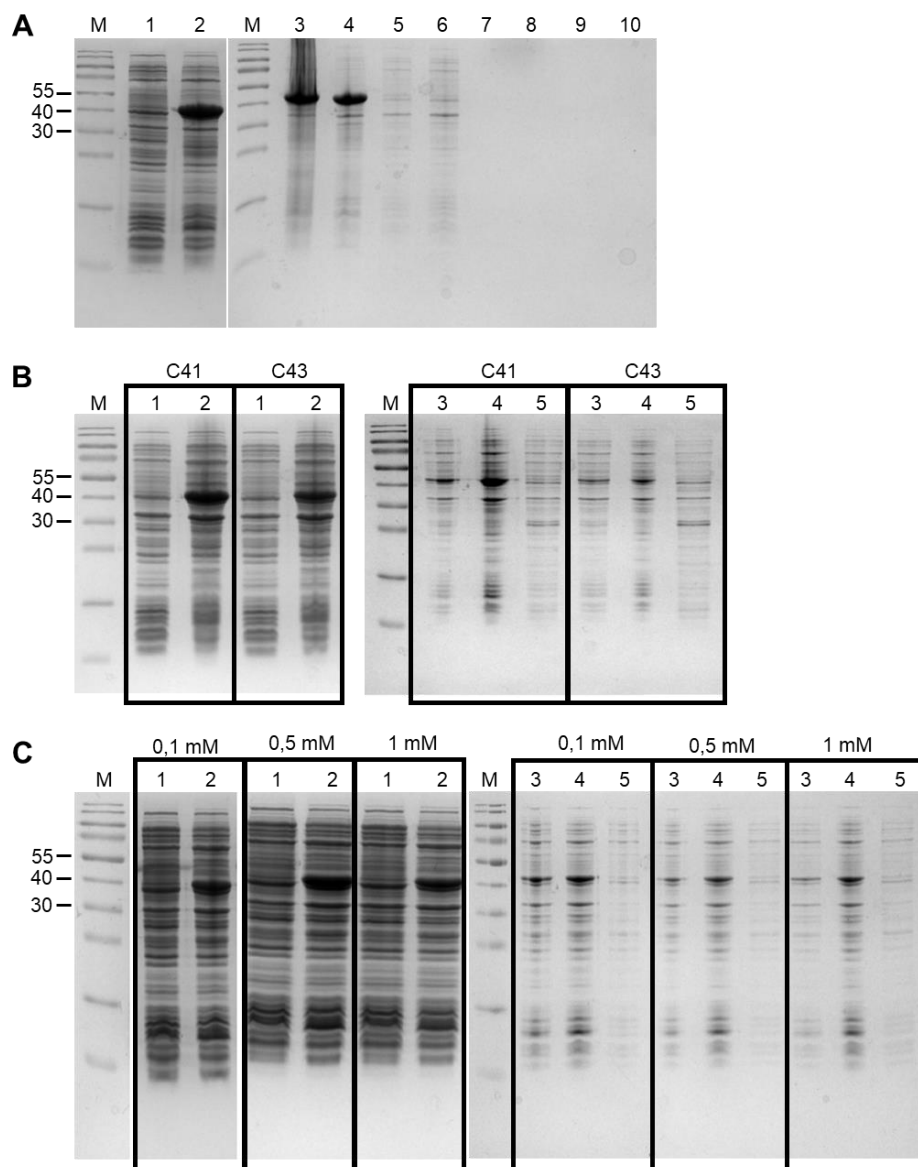




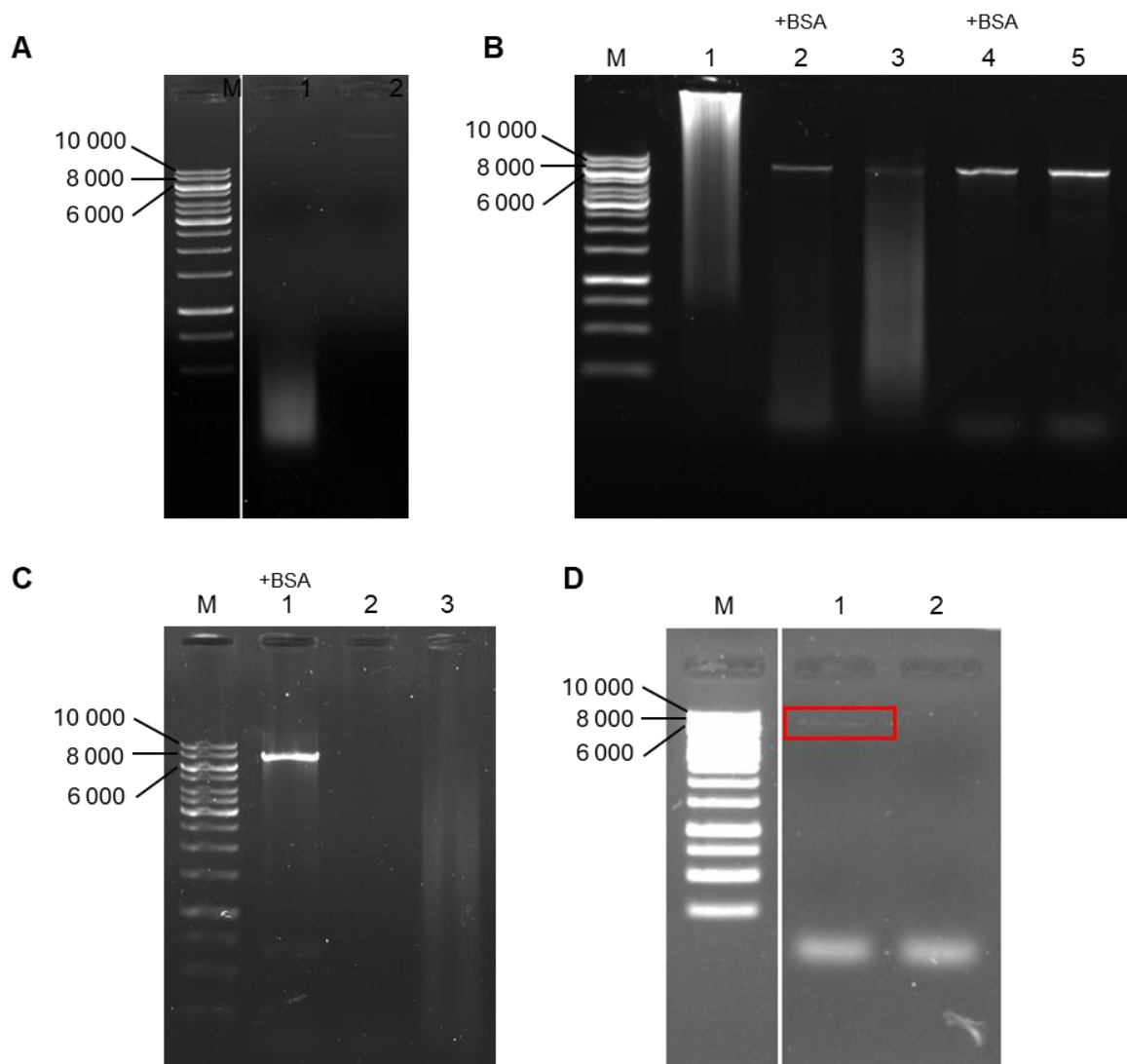




Ryc. S4. Oczyszczanie endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów substytucyjnych. Rycina przedstawia zdjęcie żelu poliakrylamidowego po elektroforezie SDS-PAGE (żel rozdzielający 10%). Po lewej stronie oznaczono masę białka (kDa) odpowiadającą wielkości prążka w białkowym wzorcu masowym. M – marker, 1 – lizat, 2 – osad, 3 – supernatant, 4 – przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 5 – płukanie kolumny, 6 – elucja.



Ryc. S5. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanego białka O3I. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja rekombinowanego białka O3I w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) przedstawione są w panelach A oraz C, natomiast w panelu B przedstawiona jest nadprodukcja w szczepach *E. coli* C41(DE3) oraz *E. coli* C43 (DE3). **A** – hodowlę bakteryjną indukowano 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C i oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja); **B** – hodowlę bakteryjną indukowano 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C; **C** – hodowlę indukowano 0,1, 0,5 i 1 mM IPTG w 18°C przez 16 godzin. Wraz z IPTG dodano także 1mM DTT w stężeniu końcowym. M - marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i następującego po nim etapu sonikacji, a w przypadku panelu A pozostałych etapów oczyszczania; 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji hodowli IPTG, 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 7 – płukanie kolumny buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu.



Ryc. S6. Mutageniza miejscowo-specyficzna *lytA_27* i *lyc2*. Na rycinie przedstawione są żele z elektroforezy w żelu agarozowym. Po lewej stronie każdego żelu znajdują się oznaczenia wielkości prążków dla markera GeneRuler 1 kb DNA Ladder. **A** – nieudana próba uzyskania wariantu genu *lytA_27*; M – marker, 1 – próbka z reakcji PCR, 2 – matryca; **B** – próba optymalizacji reakcji PCR poprzez dodatek BSA w stężeniu końcowym 50 µg/mL do matrycy; M – marker, 1 – Kontrola bez dodanej polimerazy do reakcji, 2 – próbka z 10-krotnie rozcieńczoną matrycą z dodatkiem BSA, 3 - próbka z 10-krotnie rozcieńczoną matrycą bez BSA, 4 – próbka z nierozcieńczoną matrycą i dodatkiem BSA, 5 – próbka z nierozcieńczoną matrycą bez BSA; **C** – M – marker, 1 – próbka po mutageniezie, z rozcieńczoną matrycą i dodatkiem BSA, 3 – kontrola z niedodaną polimerazą do reakcji, 4 – kontrola z niedodaną matrycą do reakcji; **D** – mutageniza miejscowo-specyficzna *lyc2*, M – marker, 1 – próbka po reakcji PCR, 2 – Kontrola bez dodanej polimerazy do reakcji.

Tab. S1. Predykcja wpływu mutacji na stabilność białka. „.” – brak wpływu; „+” – stabilizacja; „-” – obniżenie stabilności.

Nazwa białka	Wariant	Program do predykcji mutacji					
		DDMut	DDGUN	mCSM	DynaMut2	MuPro	I-Mutant

K11gp3.5	N91W	.	+	-	+	-	-
	M101W	+	+	-	-	-	-
	Q137W	+	+	-	-	-	-
	F96W	-	-	-	-	-	-
	L136W	-	-	-	-	-	-
O3I	F314W	-	-	-	-	-	-
	I321W	-	-	-	-	-	-
	V372W	-	+	-	-	-	-
LytO	Q288W	+	.	-	-	-	-
	F352W	-	-	-	-	-	-
Lyc2	M97W	+	+	-	-	-	-
	K102W	+	+	-	-	-	-
Lyt-A27	M487W	+	+	-	-	-	+
	Y492W	+	.	-	-	-	+

Tab. S2. Punkty izoelektryczne białek określone za pomocą ProtParam.

Białko	teoret. pI
K11gp3.5	8,48
LytO	8,62
LytO- domena	9,32
Ami_2	
LytA_27	4,97
Lyc2	8,36
O3I	4,86

9. Spis Tabel i Rycin

Tab. 1. Lista szczepów bakterii wykorzystanych w pracy.....(Strona 41)

Tab. 2. Tab. 2. Sekwencje nukleotydowe białek analizowanych w niniejszej pracy. Na zielono zaznaczono sekwencję nukleotydową znacznika histydynowego oraz sekwencję pochodzącą z wektora.....(Strona 42 – 46)

Tab. 3. Lista sekwencji oligonukleotydów wykorzystanych do mutagenyzy miejscowo-specyficznej.....(Strona 46 – 50)

Tab. 4. Metody wykorzystane do tworzenia modeli przestrzennych białek..... (Strona 61)

- Tab. 5. Warunki reakcji każdego przebadanego białka w teście redukcji zmętnienia**
.....(Strona 67)
- Tab. 6. Strukturalne homologi endolizyny Ts2631 pochodzenia mezofilnego. ..(Strona 104)**
- Tab. 7. Porównanie zawartości aminokwasów sekwencji aminokwasowej w endolizynie Ts2631 i domen amidazowych strukturalnie homologicznych do niej białek**
.....(Strona 105 – 106)
- Tab. 8. Specyficzność substratowa autolizyny LytO. Relatywna aktywność jest wyrażona jako procent aktywności w stosunku do *Staphylococcus aureus* MRSA KPD 425. SD – odchylenie standardowe z 3 powtórzeń.....(Strona 126 – 127)**
- Tab. 9. Spektrum aktywności bakteriolitycznej białka LytA_27.....(Strona 143)**
- Tab. 10. Spektrum aktywności białka Lyc2 wobec kilku przedstawicieli bakterii mezofilnych.....(Strona 153 – 154)**
- Tab. 11. Podsumowanie charakterystyki strukturalnych homologów endolizyny Ts2631 pochodzenia mezofilnego – temperatura topnienia (T_m) oraz aktywność lityczna. „*^m” – T_m określona w buforze PBS, pH7,4; „+^m” – białko aktywne; „-^m” – białko nieaktywne; no – nie określono.....(Strona 157)**
- Tab. S1. Predykcja wpływu mutacji na stabilność białka. „.” – brak wpływu; „+” – stabilizacja; „-” – obniżenie stabilności.....(Strona 191 – 192)**
- Tab. S2. Punkty izoelektryczne białek określone za pomocą ProtParam.....(Strona 192)**
- Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie niektórych mechanizmów oporności bakterii. A – enzymy, które produkuje bakteria doprowadzają do inaktywacji, bądź zmniejszonego działania leku. Pompy efflux odpowiadają za transport leków poza komórkę; poryny odpowiadają za zmniejszoną przepuszczalność substancji; dochodzi do inaktywacji leku poprzez jego degradację, bądź modyfikację; powstaje alternatywna ścieżka metaboliczna, która zastępuje szlak, na jaki był skierowany lek; modyfikacja miejsca wiązania antybiotyku z celem obniża powinowactwo. B – Schemat biofilmu bakteryjnego, w którym znajdują się komórki przetrwałe odporne na działanie antybiotyków (rycina inspirowana¹⁷).....(Strona 17 – 18)**
- Ryc. 2. Przykłady jednostek peptydoglikanu, jakie występują u różnych gatunków bakterii. Zielonym prostokątem oznaczono trzeci aminokwas w peptydzie macierzystym. GlcNAc – N-acetyloglukozamina; MurNAc – kwas N-acetylomuraminowy.....(Strona 25)**

Ryc. 3. Przedstawienie najczęściej spotykanych konfiguracji domenowej endolizyn. **A** – budowa globularna; **B** – budowa modułowa z domeną aktywną enzymatycznie (EAD) na N-końcu i domeną wiążącą peptydoglikan (CBD) na C-końcu; **C** – budowa modułowa z CBD na N-końcu i EAD na C-końcu białka; **D** – budowa modułowa z dwoma domenami EAD i pojedynczą domeną CBD na C-końcu białka; **E** – budowa modułowa z dwiema domenami EAD po obu końcach białka rozdzielonych domeną CBD. Czarne kreski pomiędzy domenami reprezentują linkery łączące ze sobą domeny.....(Strona 26 – 27)

Ryc. 4. Schemat przedstawiający główną podjednostkę peptydoglikanu występującego u *Thermus thermophilus* HB8 z zaznaczonymi miejscami oddziaływania endolizyn fagowych. MurNAc – kwas N-acetylmuraminowy; GlcNAc – N-acetyloglukozamina. Wyróżnione są 4 klasy enzymów, jakie występują u endolizyn z czego glikozydazy zostały podzielone ze względu na miejsce oddziaływania z peptydoglikanem.....(Strona 28)

Ryc. 5. Schemat regulacji autolizyny MepS przez system NlpI-Prc w *E. coli*. Aktywność endopeptydazy MepS (kolor turkusowy) jest regulowana przez kompleks białka adaptorowego NlpI (kolor ciemno-niebieski) z proteazą Prc (kolor jasno-niebieski). Podczas wzrostu peptydoglikanu (PGN) wysyłany jest sygnał (linia przerywana) pochodzący z błony zewnętrznej (BZ), który reguluje aktywność proteolityczną NlpI-Prc, dzięki czemu autolizyna MepS hydrolizuje wiązania PGN. W przypadku braku sygnału powstaje kompleks NlpI-Prc, który degraduje autolizynę MepS i zapobiega hydrolizie wiązań w PGN. BW – błona wewnętrzna [rycina pochodzi z publikacji i została edytowana⁷²].....(Strona 30)

Ryc. 6. Schemat przedstawiający czynniki wpływające na stabilność termiczną białek.(Strona 35)

Ryc. 7. Struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG). Klamrą zaznaczono dodatkowo naładowany fragment białka, który między innymi bierze udział w wiązaniu peptydoglikanu. N – N-koniec białka, C – C-koniec białka. Na szaro zaznaczony jest jon Zn^{2+} . Kolorem czerwonym zaznaczono dodatkowo naładowane reszty aminokwasowe: argininę (R) i lizynę (K).....(Strona 38)

Ryc. 8. Regiony endolizyny Ts2631 odpowiadająca za wiązanie z peptydoglikanem (PGN). Na różowo zaznaczone są N-końcowe wydłużenie, reszty Y60 i K70. Po prawej stronie widać przednią część rowka wiążącego PGN z zaznaczonymi resztami, które wiążą fragment PGN oznaczony kolorem zielonym [rycina wzorowana na publikacji została zmodyfikowana¹⁰⁷].....(Strona 39)

Ryc. 9. Drzewo filogenetyczne wykonane na podstawie sekwencji endolizyny Ts2631 odpowiadającej domenie rozpoznającej peptydoglikan (PGRP). Zielonym kolorem zaznaczono kład obejmujący sekwencje białek najbardziej spokrewnionych z endolizyną Ts2631, które są białkami termofilnymi. Kolorem różowym zaznaczono lizozym faga T7, który jest strukturalnym homologiem endolizyny Ts2631 i reprezentantem białek mezofilnych. Niebieskimi liniami wyróżniono kład zawierający białka eukariotyczne; 10 z nich o podanych numerach PDB stanowi najbliższe eukariotyczne homologi strukturalne endolizyny Ts2631.....(Strona 72)

Ryc. 10. Porównanie częstości występowania aminokwasów oraz struktur przestrzennych endolizyny Ts2631 i lizozymu T7. **A** – nałożone na siebie struktury endolizyny Ts2631 (kolor pomarańczowy) oraz lizozymu faga T7 (kolor niebieski). W nawiasach obok nazw białek znajdują się numery PDB. Po nałożeniu struktur uzyskano wartość średniokwadratowego odchylenia (*ang. Root Mean Square Deviation, RMSD*) równą 0,853 Å dla rdzenia białka (103 pary Ca po odfiltrowaniu par atomów przekraczających próg dopasowania), natomiast dla całego dopasowania (137 par) RMSD wyniosło 4,425 Å. Prostokątami zaznaczono wyraźnie różniące się od siebie pętle występujące w strukturach obu białek. **B** – struktury tych białek z naniesionymi wartościami czynnika B. Regiony o niższych wartościach tego czynnika oznaczono kolorem czerwonym, natomiast wyższych kolorem niebieskim. Wartości czynnika B zostały znormalizowane do wspólnej skali w celu ich porównania. **C** – porównanie występowania poszczególnych aminokwasów w sekwencji endolizyny Ts2631 i lizozymu T7.....(Strona 75 – 76)

Ryc. 11. Schemat przedstawia wzory strukturalne tryptofanu, tyrozyny, fenyloalaniny i histydy. Niebieskim kółkiem zaznaczono pierścień indolowy oraz grupę -NH tryptofanu i grupę hydroksylową tyrozyny, która znajduje się w pierścieniu benzenowym (rycina stworzona w programie BioRender).....(Strona 77)

Ryc. 12. Reprezentacja powierzchni endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG). **A** - Reszty argininy, gdzie po lewej stronie przedstawione są R2, R9, R18, R45 i R82, po środku R51, R64, R67, R142 i R150 a po prawej R12, R15, R20 i R110; **B** - Reszty prolin, gdzie od lewej strony widoczne są, P6, P23, P54, P78 i P86, po środku P35, P103, P124, P136 i P140 a po prawej P40, P73 i P107; **C** - Reszty tryptofanów z widokiem po lewej stronie na W7, W10 i W53 a po prawej W102, W109, W113 i W145; **D** – Sekwencja aminokwasowa endolizyny Ts2631 z zaznaczonymi w kwadratach resztami konserwowanymi. Czerwonymi trójkątami zaznaczone są reszty wchodzące w skład centrum aktywnego.....(Strona 83)

Ryc. 13. Trzy przykładowe wyniki przedstawiające przebieg oczyszczania endolizyny Ts2631_WT, wariantu R2A oraz wariantu P54A metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. Na rycinie ukazane są żele poliakrylamidowe po rozdziale metodą SDS-PAGE (żel rozdzielający 10%) próbek zebranych z poszczególnych etapów oczyszczania. Po lewej stronie każdego żelu oznaczono masę białka (kDa) odpowiadającą wielkości prążka w białkowym wzorcu masowym. M – marker, 1 – lizat, 2 – osad, 3 – supernatant, 4 – przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 5 – płukanie kolumny, 6 – elucja.....(Strona 84)

Ryc. 14. Analiza nanoDSF endolizyny Ts2631 w dwóch buforach. Czerwona linia reprezentuje przebieg pomiaru w buforze MES (20 mM MES, pH 7,4, 25 mM NaCl i 10% glicerol) a czarna linia w buforze HEPES (20 mM HEPES, pH 7,4 25 mM NaCl, 10% glycerol). W tabeli znajdują się określone wartości temperatury topnienia dla białka w obu buforach.....(Strona 86)

Ryc. 15. Wynik analizy nano Różnicowej Fluorymetrii Skaningowej (nanoDSF) reszt konserwowanych na powierzchni białka Ts2631 oraz jego centrum katalitycznego. Za pomocą nanoDSF zmierzono temperaturę topnienia białka oraz jego wariantów. Pomiaru dokonano w zakresie temperatur od 20°C do 110°C (maksymalna temperatura urządzenia). Na wykresie oraz w danych z tabeli znajdują się średnie wyniki z czterech pomiarów. **A** – wykresy prezentujące przebieg reakcji i wskazujące moment, w którym połowa białka znajdowała się w formie rozfałdowanej. Każdy kolor linii odpowiada poszczególnemu wariantowi białka. Pogubieniem wyszczególniono najniższe wartości T_m . **B** – tabela przedstawiające wartości T_m poszczególnych wariantów endolizyny Ts2631. **C** – Widok na centrum katalityczne endolizyny Ts2631, wewnątrz którego znajduje się Zn^{2+} (na szaro) koordynowany bezpośrednio przez H30, H131 i C139 oraz przez Y58 poprzez cząsteczkę wody (na czerwono).....(Strona 88)

Ryc. 16. Analiza stabilności termicznej oraz aktywności wariantów prolinowych endolizyny Ts2631. **A** – wykres reprezentujący wyniki z pomiarów nanoDSF. Białka analizowano w temperaturze od 20°C do 110°C. Każdy kolor reprezentuje inny wariant białka. Każdy eksperyment został powtórzony 4-krotnie. Pogrubiona linia na wykresie wskazuje na wariant o najniższej temperaturze topnienia (T_m). **B** – wyniki pomiarów T_m otrzymanych za pomocą nanoDSF; najwyższy spadek ΔT_m zaznaczono kolorem czerwonym. **C** – test redukcji zmętnienia (TRZ) przeprowadzony w 60°C przez 15 minut, przy stężeniu białka 5 $\mu\text{g/mL}$. Białka inkubowano w 90°C przez 15 minut (czerwone słupki), bądź nie (czarne słupki) i dodawano do substratu, jakim były komórki bakteryjne *Thermus thermophilus* HB8 DSM 579 z

permeabilizowaną błoną. Aktywność została wyrażona jako procent [%] relatywnej aktywności porównanej do endolizyny Ts2631, która nie była poddana inkubacji w 90°C. Eksperyment został powtórzony trzykrotnie, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta. **D** – fragment rdzenia endolizyny Ts2631 z przybliżeniem na wiązanie między C139 a P140 w pozycji *cis*. **E** – porównanie sekwencji endolizyny Ts2631 z nałożonymi 13 najbliższymi homologami strukturalnymi z bazy PDB, które znaleziono za pomocą Foldseek. 6FHG – endolizyna Ts2631; 6SU5 – endolizyna Ph2119; 6SSC – LysC; 1YCK – ludzkie PGRP-S; 5XZ4 - PGRP-SA trzmiela; 4Z8I - *Branchiostoma belcheri tsingtauense* BbtPGRP3; 2RKQ – *Drosophila melanogaster* PGRP-SD; 7NSX – *D. melanogaster* PGRP-LB; 2APH – ludzkie PGRP-IaC; 2F2L – *D. melanogaster* kompleks ektodomeny PGRP-LCa i PGRP-LCx; 5XZ3 – *Apis mellifera* PGRP-SA; 1LBA – lizozym T7; 7NT0 – *D. melanogaster* PGRP-LB; 2EAX – ludzkie PGRP-IβC. Pozycja konserwowanej proliny jest zaznaczona czerwonym prostokątem.....(Strona 92 – 93)

Ryc. 17. Analiza aktywności litycznej i temperatury topnienia wariantów tryptofanowych endolizyny Ts2631. **A** – wykres reprezentujący wyniki z pomiarów nanoDSF. Każdy eksperyment został powtórzony 4-krotnie. **B** – wyniki pomiarów T_m otrzymanych za pomocą nanoDSF. **C** – Test redukcji zmętnienia; czarne słupki wskazują na eksperyment prowadzony w 60°C przez 15 minut, przy stężeniu białka 5 μg/mL. Czerwone słupki wskazują na eksperyment, gdzie białka były inkubowane w 90°C przez 15 minut przed dodaniem do substratu, jakim były komórki bakteryjne *Thermus thermophilus* HB8 DSM 579 traktowane chloroformem. Aktywność endolizyny Ts2631, która nie była poddana inkubacji w 90°C wskazuje na 100% aktywności białka. Eksperyment został powtórzony trzykrotnie, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta. **D** – Fragmenty porównania sekwencji endolizyny Ts2631 z innymi termofilnymi białkami. Czerwonymi trójkątami wskazano na pozycję W53, W102, W109, W113 i W145.....(Strona 94)

Ryc. 18. Analiza aktywności litycznej i temperatury topnienia wariantów argininowych endolizyny Ts2631. **A** – wyniki z pomiarów nano Różnicowej Fluorymetrii Skaningowej (nanoDSF). Każdy wariant był mierzony w 4 powtórzeniach, w zakresie temperatur od 20°C do 110°C. **B** – wyniki pomiarów Temperatury topnienia (T_m) otrzymanych za pomocą nanoDSF, ΔT_m wskazuje na różnicę T_m między wariantem a Ts2631_WT. **C** – test aktywności prowadzono w 60°C przez 15 minut (stężeniu białka 5 μg/mL). Warianty były inkubowane w 90°C przez 15 minut (czerwone słupki), bądź nie (czarne słupki). Aktywność została wyrażona

jako procent [%] relatywnej aktywności porównanej do białka typu dzikiego (Ts2631_WT), która nie była poddana inkubacji w 90°C. Eksperyment został powtórzony trzy razy, słupki błędów wskazują na odchylenie standardowe; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$; Test t Studenta.....(Strona 95 – 96)

Ryc. 19. Wynik spektroskopii dichroizmu kołowego endolizyny Ts2631 i jej wariantów substytucyjnych: R20A, R51A, W53A i R82A. Białka zostały przygotowane w stężeniu 7,41 μM (0,15 mg/mL) i zawieszono je w 10 mM potasowo-fosforanowym buforze o pH 8,0 z dodatkiem 150 mM siarczanu amonu i 10% glicerolem. Pomiaru widm absorpcji dokonano w temperaturze pokojowej. Widma pokrywają się ze sobą, co może świadczyć o braku wpływu danej mutacji na strukturę II-rzędową białka.....(Strona 97)

Ryc. 20. Przykłady możliwych mostków solnych, jakie występują w endolizynie Ts2631. Zbliżenie na mostki solne, które tworzone są przez argininę. Odległość pomiędzy łańcuchami bocznymi naładowanych reszt wyrażona jest w Ångstrmach.....(Strona 98)

Ryc. 21. Nałożone na siebie struktury przestrzenne endolizyny Ts2631 i trzech homologicznych PGRP. Wskazane są pozycje R51, W53 i R82 endolizyny i odpowiadające im reszty białek homologicznych strukturą: **A** – ludzkie PGRP-I α C (na niebiesko, PDB: 2APH), **B** – ludzkie PGRP-I β C (na ciemno zielono, PDB: 2EAX), **C** – ektodomena *Drosophila melanogaster* PGRP-LCx (na różowo, PDB: 2F2L). **D** – endolizyna Ts2631 (PDB: 6FHG). Endolizyna Ts2631 ma łańcuch pokolorowany na pomarańczowo. Peptydoglikan o typie Lys jest zaznaczony żółtym kolorem, natomiast o typie DAP kolorem zielonym.....(Strona 99)

Ryc. 22. Testy wiązania peptydoglikanu. **A** – Wynik testu wiązania po przeprowadzonym rozdiale białek SDS-PAGE w żelu trycynowym. Warianty endolizyny Ts2631 dodano do peptydoglikanu wyizolowanego z *T. thermophilus* HB8, inkubowane i rozdzielone na dwie frakcje. **U** – wskazuje na frakcję supernatantu, czyli białka niezwiązanego z peptydoglikanem (PGN) natomiast **B** – to frakcja osadu, gdzie znajduje się białko związane z substratem. **CA** – anhidraza węglowa (kontrola negatywna). Prostokątami zaznaczono białka, które w większości znajdowały się we frakcji nie związanej z PGN. **M** – marker PageRuler prestained proein lader. **B** – densytometria przeprowadzona w programie ImageJ wskazująca na gęstość prążka wskazującego na obecność białka w części związanej z PGN, osadem (czarny słupek), bądź w części niezwiązanej z PGN, supernatantem (szary słupek); wynik przedstawiono w postaci procentowej. Średnia została wyznaczona z dwóch lub trzech powtórzeń (słupki błędów wskazują odchylenie standardowe). **C** – Po lewej stronie struktura przestrzenna endolizyny

Ts2631 z zaznaczonym kolorem żółtym 20-aminokwasowym regionem i resztą R20. Po prawej zbliżenie na resztę R20 oraz K70 i Y60 (oznaczone kolorem różowym), o których wiadomo, że wchodzą w interakcję w PGN.....(Strona 100 – 101)

Ryc. 23. Struktura endolizyny Ts2631 ze zbliżeniem na reszty, których podstawienie skutkowało znacznym obniżeniem temperatury topnienia. Na czerwono zaznaczono: W102, W109, P140 i W145. Na różowo: H30, H131, C139, które bezpośrednio koordynują wiązanie jonu Zn^{2+} (szara kula) a ciemno niebieskim resztę Y58, która koordynuje ten jon przez H_2O (czerwona kulka).....(Strona 102)

Ryc. 24. Fragmenty porównanych sekwencji białek po nałożeniu na siebie struktur endolizyny Ts2631 i jej strukturalnych homologów. Szarym kolorem zaznaczono R20, W102, W109, P140 i W145 z sekwencji endolizyny Ts2631 i identyczne aminokwasy białek homologicznych.....(Strona 103)

Ryc. 25. Schematyczne przedstawienie domen strukturalnych homologów pochodzenia mezofilnego endolizyny Ts2631. A – K11gp3.5; B – O3I_029140; C – LylO; D – Lyl2; E- LylA_27. Na żółto oznaczone są domeny wiążące substrat, na szaro domeny katalityczne, na niebiesko o możliwie dwójakiej funkcji a na zielono o nieznannej funkcji (*ang. Domain Unknown Function, DUF*). Linie pomiędzy nimi oznaczają linkery.....(Strona 105)

Ryc. 26. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka K11gp3.5. Nadprodukcja rekombinowanego białka K11gp3.5 w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu PBS, pH 7,4. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%).....(Strona 107)

Ryc. 27. Test aktywności endolizyny K11gp3.5 wobec dwóch różnych gatunków bakterii. Do eksperymentu wykorzystano przygotowane substraty bakteryjne z permeabilizowaną błoną zewnętrzną. Test wykonano w zakresie stężeń od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 37,5 $\mu\text{g/mL}$ w buforze PBS pH 7,4 przez 30 minut w 37°C. A – test wykonany na substracie *P. aeruginosa* PAO1. B - test

wykonany na substracie *K. pneumoniae* KPD 298. Eksperyment wykonano w trzech powtórzeniach a słupki błędu wskazują na odchylenie standardowe.....(Strona 108 – 109)

Ryc. 28. Porównanie sekwencji endolizyn Ts2631 i K11gp3.5. Zacięniowane reszty wskazują na podobieństwo aminokwasów. Czerwonymi prostokątami zaznaczono aminokwasy, które zaangażowane są w stabilność termiczną endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji endolizyny K11gp3.5.....(Strona 109)

Ryc. 29. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczanie wariantu rekombinowanego białka K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W. Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 0,1 mM IPTG (A), 0,5 mM IPTG (B) oraz 1 mM IPTG (C) przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – elucja białka ze złoża, 9 – dializa do buforu PBS, pH 7,4. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).....(Strona 110)

Ryc. 30. Porównanie aktywności endolizyny K11gp3.5 i jej wariantu K11gp3.5_N91W_M101W_Q137W. Wariant endolizyny dodatkowo został poddany 15-minutowej inkubacji w 50°C, schłodzony w lodzie i następnie poddany testowi redukcji zmętnienia. Aktywność lityczna wariantu substytucyjnego w stopniu znacznym odbiega od endolizyny typu dzikiego.....(Strona 111)

Ryc. 31. Trójwymiarowy model endolizyny K11gp3.5. Na powiększeniu zaznaczono centrum katalityczne w skład którego wchodzi triada koordynująca jon Zn^{2+} : His18, His123, Cys131. Jon Zn^{2+} zaznaczony jest szarym kolorem.....(Strona 112)

Ryc. 32. Porównanie struktury przestrzennej endolizyny Ts2631 i modelu endolizyny K11gp3.5 oraz ich sekwencji aminokwasowych. **A** – Nałożone na siebie modele endolizyn Ts2631 (na pomarańczowo) oraz K11gp3.5 (na niebiesko). Na powiększeniu zaznaczono aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz F96, M101 i L136 w sekwencji endolizyny K11gp3.5. **B** – Porównanie sekwencji aminokwasowych obu endolizyn za pomocą

ClustalO z zaznaczonymi resztami odpowiadającymi sobie w sekwencji, które u endolizyny Ts2631 są istotne z punktu widzenia stabilności termicznej.....(Strona 113)

Ryc. 33. Nadprodukcja i oczyszczanie wariantów rekombinowanego białka K11gp3.5. **A** – K11gp3.5_N91W_Q137W; **B** – K11gp3.5_F96W_L136W. Nadprodukcja rekombinowanych wariantów białka K11gp3.5 w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 0,5 mM IPTG przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie ich metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – elucja białka ze złoża, 9 – dializa do buforu PBS, pH 7,4, 10 – elucja, 11 – dializa do buforu 20 mM HEPES, pH, 7,4, 10% glicerol. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).....(Strona 114)

Ryc. 34. Optymalizacja nadprodukcji wariantu rekombinowanego białka K11gp3.5_F96W_L136W. Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) **A** – po indukcji 0,1 mM, 0,5 mM i 1 mM IPTG w 30°C; **B** – po indukcji 0,1 i 1 mM IPTG w 18°C. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i początkowych etapów oczyszczania: 1, 3 i 5 – przed indukcją, 2, 4 i 6 – po indukcji, 7, 10 i 13 – lizat, 8, 11 i 14 – osad, 9, 12 i 15 – supernatant. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 15%).....(Strona 115)

Ryc. 35. Test aktywności endolizyny K11gp3.5 i wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W. Do testu redukcji zmętnienia wykorzystano substrat bakteryjny *K. pneumoniae*. Białko doprowadzono do stężenia 5 µg/mL w buforze PBS, pH 7,4 a eksperyment przeprowadzono w 37°C przez 30 minut.....(Strona 116)

Ryc. 36. Test aktywności oraz analiza nanoDSF endolizyny K11gp3.5 i wariantu K11gp3.5_N91W_Q137W w dwóch różnych buforach i temperaturach. **A** – W teście redukcji zmętnienia (TRZ) białka doprowadzono do stężenia 5 µg/mL i dodawano do substratu z komórek *K. pneumoniae*. Reakcję prowadzono przez 30 minut w 37°C w buforze HEPES (20 mM HEPES, pH 7,4, 25 mM NaCl) oraz PBS (PBS, pH 7,4); **B** – wykres przedstawiający krzywą określającą temperaturę topnienia (T_m) uzyskanej po przeprowadzeniu nanoDSF; **C** – tabela porównująca wyniki z testu aktywności w zależności od temperatury, w jakiej białko

było inkubowane przed TRZ oraz przedstawiająca T_m wariantów białka w poszczególnych buforach.....(Strona 118)

Ryc. 37. Model przestrzenny autolizyny LytO. A – Model białka z zaznaczonymi poszczególnymi domenami. Kolorem śliwkowym zaznaczono domenę CHAP, kolorem zielonym domenę N-acetylo-muramylo-L-alaninową, kolorem niebieskim domenę SH3 a na czarno zaznaczone są linkery. **B** – W modelu białka LytO wyróżniono centra katalityczne białek oraz miejsca wiązania jonów niezbędnych do aktywności białka. Kolorem zielonym oznaczono Ca^{2+} a szarym Zn^{2+} (Strona 121)

Ryc. 38. Porównanie sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 i domeny amidazy białka LytO. A – Szare prostokąty wskazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacięniowania: 100%). Czerwonymi prostokątami oznaczono reszty, które są istotne w stabilności termicznej endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji domenie amidazy białka LytO. **B** – Nałożone na siebie struktura endolizyny Ts2631 (na pomarańczowo) oraz domeny amidazy autolizyny LytO (na zielono). Na powiększeniu zaznaczono aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz N107, Q115 i F179 w sekwencji domeny amidazy LytO.....(Strona 123)

Ryc. 39. Nadprodukcja i oczyszczanie autolizyny LytO. Nadprodukcja rekombinowanego białka LytO w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 16 godzin **A** – w 25° i w **B** – 18°C oraz oczyszczanie ich metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12,5%). Strzałką wskazany jest prążek odpowiadający masie molekularnej białka.(Strona 124)

Ryc. 40. Analiza aktywności białka LytO w różnych warunkach. Wszystkie testy były prowadzone przez 30 minut w 37°C, przy zastosowaniu białka o stężeniu 62,5 µg/mL. Substrat jaki zastosowano to: *S. aureus* KPD 425 (MRSA). **A** – testowanie różnych stężenie białka; **B** – test aktywności w zależności od pH buforu; **C** – test aktywności w zależności od stężenia NaCl w 10 mM buforze fosforanowo-potasowym (Kpi), pH 8,0; **D** – test aktywności w buforze Kpi, pH 8,0 z 500 mM NaCl.....(Strona 125)

Ryc. 41. Nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazy autolizyny LytO oraz jej wariantu. Nadprodukcja rekombinowanych białek w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 16 godzin w 18°C oraz oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji, 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. **A** – nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazowej białka typu dzikiego; **B** – nadprodukcja i oczyszczanie domeny amidazowej wariantu Q115W_F179W. Preparaty białkowe rozdzielono za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Strzałką wskazany jest prążek odpowiadający masie molekularnej białka.....(Strona 127 – 128)

Ryc. 42. Test aktywności oraz analiza nanoDSF domeny amidazy białka LytO oraz wariantu Q115W_F179W. **A** – Test redukcji zmętnienia (TRZ) przeprowadzono z wykorzystaniem białka o stężeniu 125 µg/mL, w buforze 10 mM Kpi, pH 8,0 przeciw *S. aureus* KPD 425. Test prowadzono w temperaturze 37°C, a białko w 40, 50 i 60°C było wstępnie inkubowane przez 15 minut, po czym poddane TRZ. Czarny słupek wskazuje na wynik TRZ białka typu dzikiego a czerwony wskazuje na wariant. Do analizy statystycznej wykorzystano test *t* Studenta, gdzie $p \leq 0,01$ *. Każdy pomiar wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki są przedstawione w postaci relatywnej aktywności, gdzie 100% stanowił spadek gęstości optycznej białka typu dzikiego w 37°C. **B** – wynik pomiaru temperatury topnienia obu białek. Wykres wskazuje na jakościowy pomiar a w tabeli zestawione są wyniki pomiaru T_m w dwóch różnych buforach.....(Strona 129 – 130)

Ryc. 43. Model przestrzenny białka O3I_029140. **A** – Model białka z zaznaczonymi poszczególnymi domenami. Na szaro zaznaczona jest hydrolaza glikozydowa, a ciemno-pomarańczowo domena N-acetylo-muramylo-L-alaninowa, które połączone są ze sobą czarnym linkerem. **B** – W modelu białka zaznaczone i powiększone są centra aktywne obu domen. W domenie amidazy zostały zaznaczone reszty koordynujące Zn^{2+} (szara kula).....(Strona 132)

Ryc. 44. Porównanie sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 z O3I_029140. **A** – Prostokąty w szarym odcieniu pokazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacieniowania: 100%). Czerwonymi prostokątami oznaczono reszty, które są istotne w stabilności termicznej endolizyny Ts2631 i odpowiadają sekwencji domenie amidazy białka O3I_029140. **B** - Na

rycinie pokazany jest model domeny amidazy białka O3I_029140 nałożony na strukturę endolizyny Ts2631 (jasny pomarańczowy). Na powiększeniu zaznaczone są aminokwasy odpowiadające sobie w sekwencjach obu białek, które nie są identyczne. Są to W102, W109 i W145 w sekwencji endolizyny Ts2631 oraz F314, I321, V372 w sekwencji białka pochodzenia mezofilnego.....(Strona 133)

Ryc. 45. Model przestrzenny białka LytA_27. A – na rycinie zaznaczone są domeny białka: Proteaza cysteinowa na różowo i N-końcu białka, domena wiążąca cholinę na beżowo występuje na środku, a amidaza znajduje się na C-końcu pokolorowana na pomarańczowo. Domeny połączone są ze sobą linkerami oznaczonymi czarnym kolorem. B – zbliżenie na miejsca aktywne występujące w dwóch domenach katalitycznych LytA_27. W proteazie cysteinowej są to: Q49, C55, H199 i N215 (po lewej) a w amidazie zaznaczone są reszty koordynujące Zn²⁺ (H413, H514, C522, po prawej stronie).....(Strona 135)

Ryc. 46. Porównanie sekwencji aminokwasowej endolizyny Ts2631 i białka LytA_27. A – Porównanie sekwencji aminokwasowych obu białek z wyróżnionymi na czerwono aminokwasami, odpowiadającymi u endolizyny Ts2631 odpowiadają za stabilność termiczną i ich odpowiednikami w sekwencji LytA_27. Prostokąty w szarym odcieniu pokazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacielenia: 100%). B – Nałożone na siebie modele przestrzenne białek z zaznaczonymi aminokwasami, które odpowiadają sobie w sekwencji i będą zamienione w sekwencji białka LytA_27.....(Strona 136)

Ryc. 47. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczanie białka LytA_27. Nadprodukcja rekombinowanych białek w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) bądź *E. coli* C41(DE3), *E. coli* C43(DE3) po indukcji 0,1, 0,5 lub 1 mM IPTG przez 4 godzinach w 30°C, albo 37°C bądź przez 16 godzin w 18°C według oznaczeń na rycinie. Oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa jonów metali. M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. A – nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka, czerwoną strzałką wskazany jest prążek odpowiadający wielkości LytA_27. B – optymalizacja nadprodukcji w 18°C i 30°C, nad prostokątami znajduje się stężenie, jakie wykorzystano przy danej nadprodukcji oraz przy następującej po niej sonikacji i wirowaniu lizatu. C – Nadprodukcja, gdzie bezpośrednio przed indukcją hodowli bakteryjnej inkubowana była przez 20 minut w

42°C. **D** – Nadprodukcja w systemie ekspresyjnym *E. coli* C41(DE3) i *E. coli* C43(DE3), stężenie IPTG 1 mM. **E** – Optymalizacja nadprodukcji z dodanie 1 mM ditiotreitolu (DTT) podczas indukcji. Nad prostokątami wskazane jest stężenie IPTG, jakie dodano podczas nadprodukcji. **F** – oczyszczanie białka z wiązaniem złoża na kolumnie ze złożem kobaltowym przez 20 minut. **G** – wiązanie białka ze złożem przez noc.....(**Strona 138**)

Ryc. 48. Analiza aktywności białka LytA_27 w różnych warunkach. Pierwszy test (A) był prowadzony przez 30 minut w 37°C, przy zastosowaniu białka o różnym stężeniu w buforze: 20 mM HEPES, pH 7,4. Do pozostałych testów (B – D) użyto białko w stężeniu 25 µg/mL i reakcję prowadzono przez 15 minut oraz korzystano z różnych buforów. Substrat jaki zastosowano to: *Clostridium beijerinckii* DSM 791. **A** – testowanie różnych stężeń białka; **B** – test aktywności w zależności od pH buforu; **C** – test aktywności w zależności od stężenia NaCl w 20 mM HEPES, pH 8,0; **D** – test aktywności w buforze 20 mM HEPES, pH 8,0, 200 mM NaCl w zależności od temperatury.....(**Strona 142**)

Ryc. 49. Wynik nanoDSF określony dla prawdopodobnej autolizyny LytA_27 oraz jej wariantu LytA_27-M487W_Y492W. Określona została temperatura topnienia białka przy wykreśleniu pierwszej pochodnej z fal o długości 350/330 nm, której odczyt zmieniał się wraz z wzrostem temperatury. Dla poprawy czytelności wykresu wartości z pierwszej pochodnej zostały pomnożone przez -1. Czarną linią oznaczony jest wynik dla białka typu dzikiego (WT) a czerwoną wariant (M487W_Y492W).....(**Strona 145 – 146**)

Ryc. 50. Model przestrzenny Lyc2. **A** – zaznaczone są domeny występujące w białku. **B** – Zbliżenie na centrum katalityczne białka Lyc2 w domenie amidazy.....(**Strona 148**)

Ryc. 51. Porównanie sekwencji endolizyny Ts2631 i prawdopodobnej autolizyny Lyc2. **A** – Porównanie sekwencji aminokwasowych endolizyny Ts2631 i białka Lyc2. Szare prostokąty pokazują podobieństwo aminokwasów (próg dla zacieniowania: 100%). **B** – Model przestrzenny Lyc2 (na niebiesko) oraz struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG, na pomarańczowo), gdzie zaznaczone są dwie reszty odpowiadające za stabilność termiczną u endolizyny Ts2631 (W102, W109) oraz odpowiadające im w sekwencji reszty białka Lyc2 (M97, K102).....(**Strona 149**)

Ryc. 52. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka Lyc2. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja w systemie ekspresyjnym *E. coli* po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z

przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu.....(Strona 150)

Ryc. 53. Analiza optymalnych warunków aktywności litycznej białka Lyc2. Aktywność była mierzona za pomocą testu redukcji zmętnienia, za pomocą którego mierzy się spadek gęstości optycznej przy długości fali 600 nm. Zastosowanym substratem były komórki bakteryjne *C. felsineum* DSM 794. Test prowadzono w 37°C przez 2 godziny. **A** – Aktywność białka w zależności od stężenia w buforze 20 mM HEPES, pH 7,4. **B** – Wpływ pH na aktywność bakteriolityczną Lyc2. **C** – Wpływ NaCl na białko Lyc2. **D** – Optymalna temperatura dla aktywności bakteriolitycznej białka.....(Strona 151)

Ryc. 54. Analiza nanoDSF białka Lyc2. Każdy eksperyment był przeprowadzony przy wykorzystaniu 4 kapilar. Białka były zawieszane w 10 mM buforze fosforanowo-potasowym, pH 8,0 z dodatkiem 10% glicerolu.....(Strona 154)

Ryc. 55. Nadprodukcja i oczyszczanie wariantu M97W_K102W rekombinowanego białka Lyc2. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) po indukcji 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C oraz oczyszczanie białka metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja). M – marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i oczyszczania: 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji. 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6 – przesącz niezwiązanych ze złożem białek, 7 – płukanie buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu. Czerwoną strzałką wskazany jest prążek odpowiadający wielkości wariantu białka Lyc2-M97W_K102W.....(Strona 156)

Ryc. S1. Struktura przestrzenna endolizyny Ts2631 (PDB: 6FHG) z zaznaczonymi resztami seryny S88 i S98.....(Strona 184)

Ryc. S2. Rozkład aminokwasów w poszczególnych sekwencjach białek termofilnych.....(Strona 184)

Ryc. S3. Przedstawienie rozkładu procentowego poszczególnych aminokwasów występujących w endolizynie Ts2631 oraz wirusach (518 140 białek) i bakteriach (30 290 647 białek).....(Strona 185)

Ryc. S4. Oczyszczanie endolizyny Ts2631 oraz jej wariantów substytucyjnych. Rycina przedstawia zdjęcie żelu poliakrylamidowego po elektroforezie SDS-PAGE (żel rozdzielający 10%). Po lewej stronie oznaczono masę białka (kDa) odpowiadającą wielkości prążka w białkowym wzorcu masowym. M – marker, 1 – lizat, 2 – osad, 3 – supernatant, 4 – przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 5 – płukanie kolumny, 6 – elucja.....(Strona 186 – 189)

Ryc. S5. Optymalizacja nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanego białka O3I. Rozdział białek za pomocą elektroforezy SDS-PAGE (żel rozdzielający 12.5%). Nadprodukcja rekombinowanego białka O3I w systemie ekspresyjnym *E. coli* BL21(DE3) przedstawione są w panelach A oraz C, natomiast w panelu B przedstawiona jest nadprodukcja w szczepach *E. coli* C41(DE3) oraz *E. coli*C43 (DE3). **A** – hodowlę bakteryjną indukowano 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C i oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa jonów metali według zaleceń producenta w kolumnie z przepływem grawitacyjnym (Takara Bio Europe, Szwecja); **B** – hodowlę bakteryjną indukowano 1 mM IPTG przez 4 godziny w 37°C; **C** – hodowlę indukowano 0,1, 0,5 i 1 mM IPTG w 18°C przez 16 godzin. Wraz z IPTG dodano także 1mM DTT w stężeniu końcowym. M - marker Page Ruler prestained, 10 do 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Ścieżki oznaczone cyframi reprezentują frakcje z poszczególnych etapów nadprodukcji i następującego po nim etapu sonikacji, a w przypadku panelu A pozostałych etapów oczyszczania; 1 – przed indukcją, 2 – po indukcji hodowli IPTG, 3 – lizat, 4 – osad, 5 – supernatant, 6- przesącz białek niezwiązanych ze złożem, 7 – płukanie kolumny buforem z 10 mM imidazolem, 8 – płukanie buforem z 20 mM imidazolem, 9 – elucja białka ze złoża, 10 – dializa do buforu.....(Strona 190)

Ryc. S6. Mutageniza miejscowo-specyficzna *lytA_27* i *lyc2*. Na rycinie przedstawione są żele z elektroforezy w żelu agarozowym. Po lewej stronie każdego żelu znajdują się oznaczenia wielkości prążków dla markera GeneRuler 1 kb DNA Ladder. **A** – nieudana próba uzyskania wariantu genu *lytA_27*; M – marker, 1 – próbka z reakcji PCR, 2 – matryca; **B** – próba optymalizacji reakcji PCR poprzez dodatek BSA w stężeniu końcowym 50 µg/mL do matrycy; M – marker, 1 – Kontrola bez dodanej polimerazy do reakcji, 2 – próbka z 10-krotnie rozcieńczoną matrycą z dodatkiem BSA, 3 - próbka z 10-krotnie rozcieńczoną matrycą bez BSA, 4 – próbka z nierozcieńczoną matrycą i dodatkiem BSA, 5 – próbka z nierozcieńczoną matrycą bez BSA; **C** – M – marker, 1 – próba po mutageniezie, z rozcieńczoną matrycą i

dotądkiem BSA, 3 – kontrola z niedodaną polimerazą do reakcji, 4 – kontrola z niedodaną matrycą do reakcji; **D** – mutageneza miejscowo-specyficzna *lyc2*, M – marker, 1 – próbka po reakcji PCR, 2 – Kontrola bez dodanej polimerazy do reakcji.....(**Strona 191**)