

Bakterie, w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiska, takie jak niedobór składników odżywczych, czy też stres wywołany obecnością antybiotyków wykształcają szereg mechanizmów obronnych, umożliwiających im przetrwanie. Manifestuje się to między innymi poprzez wzrastającą liczbę zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt oraz występowaniem nawracających i chronicznych infekcji. Ze względu na trudności terapeutyczne związane z ciągle postępującym wzrostem oporności wielu bakterii na antybiotyki, czy też stosunkowo niedawno odkrytą ich zdolnością do tworzenia w obrębie populacji frakcji komórek szczególnie opornych na zaistniałe warunki (określanych jako *persister cells*) istotne jest badanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za powyższe zjawiska. Najnowsze badania pokazują, że jednostki zwane systemami toksyna-antytoksyna (ang. *toxin-antitoxin systems*, *TA systems*) mogą odgrywać istotną rolę w wytwarzaniu komórek typu *persister* oraz wirulencji bakterii. W obrębie genomów tych mikroorganizmów jednostki TA są szeroko rozpowszechnione i tworzą operony złożone z genu toksyny, kodującego stabilne białko wykazujące toksyczność dla komórek bakterii oraz genu antytoksyny, kodującego niestabilny inhibitor toksyny o różnej naturze biochemicznej (RNA lub białko). Systemy TA identyfikowane są zarówno w puli plazmidowego, jak i chromosomowego DNA bakterii. Tym pierwszym przypisuje się rolę w utrzymywaniu plazmidów w populacji bakteryjnej. Istnieją również dowody wskazujące na udział tych jednostek w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za wirulencję bakterii. Rola chromosomowych systemów TA stanowi obecnie obiekt żywej dyskusji. Z jednej strony wskazuje się na ich potencjalny udział w zjadliwości bakterii (poprzez wpływ na formowanie komórek typu *persister*, czy też tworzenie biofilmu bakteryjnego). Z drugiej natomiast, przypisuje się im miano samolubnych elementów genetycznych, które po zmianie lokalizacji z plazmidowej na chromosomową ulegają degradacji i stają się niefunkcjonalnymi pseudogenami.

Obiektem badań przedstawionych w projekcie jest system toksyna-antytoksyna *pemIK_{Sp}*, zidentyfikowany w chromosomowym DNA szczepów bakterii gronkowca *Staphylococcus pseudintermedius*. W toku analiz bioinformatycznych, dla badanego systemu wykazano wysoką heterogeniczność przejawiającą się występowaniem dwóch wariantów toksyny i aż pięciu wariantów antytoksyny. Co istotne, wykazano również homologię tego układu do plazmidowego systemu TA, występującego u bakterii *S. aureus*, o potwierdzonym wpływie na wirulencję bakterii. W toku badań wstępnych wykazano, że toksyna PemK_{Sp} wykazuje zdolność do rozkładu kwasu rybonukleinowego (RNA) z którego zbudowane są transkrypty genów. Natomiast antytoksyna PemI_{Sp} jest inhibitorem toksyny. Stąd też głównym celem projektu jest określenie funkcji biologicznej systemu *pemIK_{Sp}* w komórkach *S. pseudintermedius*, w kontekście zmiany lokalizacji genów kodujących ten układ z plazmidowej na chromosomową, z drugiej wpływu zmian strukturalnych w poszczególnych wariantach systemu na jego aktywność. Zaplanowane badania podzielone będą na etapy, z których pierwszy polegał będzie na określeniu sekwencji w obrębie której degradowane mogą być transkrypty genów rozpoznawanej przez oba warianty toksyny PemK_{Sp} co w zamyśle umożliwi wskazanie potencjalnej roli badanego systemu TA w regulacji ekspresji genów. W drugim etapie planowane jest zbadanie właściwości wariantów antytoksyn PemI_{Sp}, co pozwoli odpowiedzieć na pytanie czy układ TA jako całość jest funkcjonalny. Następnie zbadane zostaną możliwości oddziaływania *in vitro* oraz *in vivo* komponentów systemu PemIK_{Sp}, jak również ich krzyżowej interakcji z białkami homologicznego systemu z *S. aureus*, co umożliwi uzyskanie informacji na temat ewolucji tych układów u tych bakterii. W ostatnim etapie zostaną podjęte próby krystalizacji toksyny PemK_{Sp} w celu określenia jej struktury przestrzennej oraz porównania do analogicznych prób dla toksyn PemK_{Sp}.

Tematyka projektu w całości wpisuje się w obecnie prowadzoną debatę na temat roli i ewolucji ulokowanych w chromosomowym DNA systemów toksyna-antytoksyna. Zrealizowanie założonych zadań badawczych pozwoli określić funkcjonalności i funkcję systemu *pemIK_{Sp}* w komórkach *Staphylococcus pseudintermedius*. Ponadto określi, czy ewentualna różna funkcjonalność ma związek z obserwowanymi wariantami komponentów układu, co pozwoli odnieść się do doniesień literaturowych na temat możliwej degradacji systemów toksyna-antytoksyna po zmianie lokalizacji z plazmidowej na chromosomową lub przeciwnie wskazać na możliwość pełnienia przez ten układ wyrafinowanej roli regulacyjnej.