

Cel projektu: Celem naukowym projektu jest zbadanie roli genów operonu ferrytyny *Listeria monocytogenes* (tj. genów *lmo0944*, *lmo0945*, *lmo0946* oraz *lhrC5*) w procesie patogenezy, oporności na antybiotyki i adaptacji do różnych warunków stresowych oraz zbadanie znaczenia posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji badanych genów przy udziale 3 małych antisensownych RNA kodowanych w obrębie tego operonu, a także określenie wpływu badanych genów na globalną ekspresję genów *L. monocytogenes* w procesie patogenezy.

Badania podstawowe realizowane w projekcie: Ferrytyna jest białkiem, które pełni istotną rolę w procesie patogenezy, oporności na β -laktamy oraz odpowiedzi na różne warunki stresowe chorobotwórczej dla człowieka bakterii *L. monocytogenes*. Białko to jest kodowane przez pierwszy gen operonu, w którym zlokalizowane są jeszcze 4 geny, których fizjologiczna funkcja i rola w adaptacji do stresu pozostaje dotychczas nieznana. W projekcie zamierzamy zbadać rolę oraz wyjaśnić mechanizm działania tych nieznanych genów operonu ferrytyny dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej, klasycznych metod mikrobiologicznych oraz nowoczesnych metod wysokoprzepustowej analizy transkryptomicznej, a także wykorzystując metody kultur tkankowych i model zwierzęcy. Badania rozpoczniemy od konstrukcji szczepów mutantów punktowych w genach operonu ferrytyny oraz genach kodujących małe antisensowne RNA. Uzyskane szczepy mutantów zostaną następnie wykorzystane do przeprowadzenia szeroko zakrojonej analizy fizjologicznej metodami mikrobiologicznymi, w trakcie której właściwości szczepów zmutowanych zostaną porównane z właściwościami szczepu dzikiego *L. monocytogenes*. Badania te będą obejmowały ocenę zdolności wzrostu i przetrwania w różnych warunkach stresowych (stres temperaturowy, osmotyczny, oksydacyjny, wynikający z zakwaszenia środowiska, starzenia się hodowli, obecności alkoholu), określenie zdolności do wzrostu na różnych źródłach żelaza i w warunkach limitacji żelaza, określenie wrażliwości na antybiotyki oraz określenie wpływu poszczególnych mutacji na zdolność inwazji, namnażania i międzykomórkowego rozprzestrzeniania w hodowlach tkankowych oraz wirulencję *L. monocytogenes* w mysim modelu infekcji. Badania będą również obejmować porównawczą analizę transkryptomiczną szczepów mutantów i szczepu dzikiego, która zostanie wykonana z zastosowaniem metod sekwencjonowania RNA i qRT-PCR, co pozwoli wyjaśnić w jaki sposób geny analizowanego operonu wpływają na globalną ekspresję genów *L. monocytogenes* w procesie patogenezy. Wyniki naszych badań wstępnych wskazują, że geny operonu ferrytyny najprawdopodobniej kodują dotychczas niezidentyfikowane czynniki wirulencji, oporności na antybiotyki oraz adaptacji do warunków stresowych. Przeprowadzenie zaplanowanych badań pozwoli potwierdzić tę hipotezę, a tym samym dostarczy nowych i ważnych informacji dotyczących fizjologii chorobotwórczej bakterii *L. monocytogenes*. Badania te dostarczą też nowych danych na temat regulacji ekspresji genów pełniących ważną rolę w adaptacji bakterii do warunków stresowych przy udziale małych RNA. W ten sposób poszerzymy naszą wiedzę na temat mechanizmów i strategii wykorzystywanych przez bakterie chorobotwórcze w celu przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiska.

Powody podjęcia tematyki badawczej: *L. monocytogenes* jest Gram-dodatnim, oportunistycznym patogenem, który wykazuje zdolność przeżycia i wzrostu w szerokim zakresie warunków środowiska. *L. monocytogenes* może wywoływać szereg schorzeń ludzi i zwierząt noszących wspólną nazwę listerioz. Do najczęstszych objawów chorobowych należą zapalenie opon mózgowych i mózgu, posocznica oraz zakażenia okołoporodowe. Bakteria ta występuje powszechnie w środowisku naturalnym, a co za tym idzie, często jest obecna także na surowcach wykorzystywanych w przemyśle spożywczym. *L. monocytogenes* jest doskonale przystosowana do przetrwania zabiegów stosowanych w obróbce żywności tj. dobrze toleruje wysokie stężenia soli i niskie wartości pH, a co gorsza, jest zdolna do namnażania się w temperaturach chłodniczych i przetrwania w produktach mrożonych. Przypadki listerioz, infekcji charakteryzujących się śmiertelnością sięgającą aż do 30 % przypadków pomimo podjęcia terapii antybiotykowej, wiążą się ze spożyciem pokarmów zanieczyszczonych przez ten mikroorganizm. Starając się obniżyć ludzkie i ekonomiczne koszty związane z listeriozami, niezmiernie istotne jest opracowanie metod zapobiegania przetrwaniu i wzrostowi *L. monocytogenes* w środowisku klinicznym i poza klinicznym. W związku z powyższym, jednym z podstawowych celów prac badawczych powinna być identyfikacja i charakterystyka genów tej bakterii odpowiadających za wirulencję, oporność na antybiotyki oraz przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska takich jak niska temperatura, wysokie stężenie soli i niskie pH. Poznanie mechanizmów, które leżą u podstaw tych zjawisk może przyczynić się do opracowania nowych strategii walki z *L. monocytogenes*.