

Według doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), *Mycobacterium tuberculosis* (prątek gruźlicy) – drobnoustroj atakujący człowieka i czynnik etiologiczny gruźlicy, w 2017 roku pozbawił życia około 1,5 mln ludzi na świecie. Obecnie prawie 2 mld ludzi na świecie jest zakażone prątkiem gruźlicy a patogen ten jest uważany za jedno z najbardziej niebezpiecznych zagrożeń pochodzenia bakteryjnego, dla globalnego systemu ochrony zdrowia. Leczenie gruźlicy wymaga podawania czterech lub pięciu antybiotyków przeciwprątkowych przez wiele miesięcy. Niepokojące jest coraz częstsze pojawianie się szczepów gruźlicy odpornej na stosowane leki lub wielolekoopornej.

Przerwanie ciągłości pojedynczej lub obu nici podwójnej helisy DNA może być śmiertelne dla mikroorganizmu, może bowiem skutkować mutacjami, czy fragmentacją genomu, a przez to doprowadzić do całkowitej utraty żywotności. Prątki wykształciły szereg mechanizmów naprawczych co ma związek z patogenezą. W trakcie infekcji, mykobakterie bytują w ludzkich aktywowanych makrofagach, które produkują istotne ilości reaktywnych form tlenu i azotu, powodujących uszkodzenia DNA takie jak utlenianie guaniny czy deaminacja zasad azotowych. Prątki przeżywają a nawet są w stanie intensywnie się namnażać wewnątrz makrofagów dzięki wielu mechanizmom obronnym oraz czynnikom wirulencji. Bakterie te posiadają między innymi różnorodne szlaki napraw DNA, z charakterystycznie rozbudowanym systemem napraw uszkodzonych zasad azotowych (z ang. base excision repair, BER) i co najmniej trzy szlaki napraw pęknięć obu nici DNA.

Najnowsze doniesienia w renomowanych czasopismach naukowych ujawniły istnienie u prątków nieopisanych dotąd mechanizmów naprawy DNA. Kierownik projektu uczestniczył w odkryciu systemu napraw źle sparowanych nukleotydów u mykobakterii, działającego z udziałem nukleazy NucS, podobnej do enzymów archeonów [Castaneda-Garcia et al. *Nat Com*, 2017] oraz w opisanie szlaku napraw BER, działającego z udziałem archeo-eukariotycznej prymazy-polimerazy Prim-PolC, aktywnej podczas stacjonarnej fazy wzrostu bakterii [Plocinski et al. *Nat Com*, 2017].

Proponowane badania zostały zaprojektowane w celu dokładnego zbadania mechanizmów napraw pęknięć podwójnej helisy DNA, jak również pęknięć pojedynczej nici DNA, czy braku pojedynczego nukleotydu, na modelach mykobakteryjnych. **Pierwszym celem projektu jest udokumentowanie aktywności mechanizmów napraw pęknięć DNA w fazie wzrostu logarytmicznego i stacjonarnego, oraz zrozumienie w jaki sposób następuje wybór konkretnej ścieżki naprawy. Projekt zakłada odkrycie i opisanie nowych, dotąd niezbadanych czynników napraw DNA biorących udział w rozpoznawaniu uszkodzeń, zidentyfikowanych na podstawie wcześniejszych badań własnych.** Planowane eksperymenty zakładają wykorzystanie szeregu technik mikrobiologii, biochemii i biologii molekularnej. W ramach projektu zostaną przeprowadzone badania proteomiczne, między innymi identyfikacja oddziaływań białko-DNA i białko-białko z wykorzystaniem spektrometrii mas. Ponieważ naprawy DNA aktywne w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii wprowadzają do DNA rybonukleotydy, same w sobie stanowią elementy niestabilności genetycznej i docelowo wymagają dalszej naprawy. Taką aktywnością charakteryzuje się system wycinania rybonukleotydów, jak dotąd nie opisany u mykobakterii. **Drugim celem projektu jest zbadanie i opisanie mechanizmów wycinania fragmentów z wbudowanymi rybonukleotydami w celu odzyskania pełnej integralności genomu prątków kwasoopornych.** Sekwencjonowanie nowej generacji (technologia Nanopore i Illumina) DNA izolowanego ze szczepów mykobakterii poddanych działaniu genotoksycznych czynników utleniających pozwoli na zbadanie procesów wprowadzania rybonukleotydów do genomu i umożliwi śledzenie napraw pęknięć nici DNA w czasie rzeczywistym.

Projekt zakłada intensywne badania nad mechanizmami napraw pęknięć DNA, które z zasady są konserwowane ewolucyjnie u bakterii i eukariontów. Z tego względu, otrzymane wyniki pozwolą lepiej zrozumieć analogiczne mechanizmy u ludzi, związane z nowotworzeniem, starzeniem się oraz wieloma innymi zagadnieniami. Ponadto, znalezienie unikalnych aktywności lub procesów naprawczych może przyczynić się do zaprojektowania nowatorskich terapii przeciwprątkowych.