

Analiza funkcjonalna genomów bakteriofagów *Staphylococcus aureus* z rodzaju *Kayvirus* w poszukiwaniu molekularnych podstaw szerokiej specyficzności i strategii przetrwania w populacji z gospodarzem

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest jedną z dominujących bakterii chorobotwórczych dla człowieka. Zaliczany jest do tzw. grupy **ESKAPE** - bakterii, które są wiodącą przyczyną infekcji szpitalnych z uwagi na zdolność do szybkiego nabywania oporności na antybiotyki. Zakres schorzeń powodowanych przez gronkowca złocistego waha się od niewielkich ubytków skórnych poprzez głębokie rany skóry i tkanek miękkich, a kończąc na zagrażających życiu chorobach inwazyjnych takich jak sepsa, zapalenie wsierdza, czy zespół szoku toksycznego. **Narastający problem oporności szczepów gronkowca złocistego na antybiotyki stał się przyczyną zainteresowania alternatywnymi dla antybiotyków środkami walki z tą bakterią.** Wśród nich są bakteriofagi - naturalnie występujące wirusy bakteryjne, nieszkodliwe dla komórek zwierząt, roślin i człowieka. **Bakteriofagi z rodzaju *Kayvirus* są bezwzględnie litycznymi fagami, które infekują i zabijają komórki większości szczepów gronkowca złocistego izolowanych od pacjentów, w tym szczepy antybiotykooporne.** Sprawdzały się jako skuteczne środki przeciwgronkowcowe w eksperymentalnych terapiach zakażeń tą bakterią u ludzi i zwierząt. Problemem jest niewystarczająca wiedza o ich biologii i cechach zapewniających zdolność do tak skutecznej infekcji, niezbędna do zrozumienia ich interakcji z bakteriami i oceny bezpieczeństwa stosowania. Funkcje ponad połowy z ~200 genów tych bakteriofagów są nieznane. Nie wiadomo też, dlaczego nieliczne szczepy gronkowca złocistego nie są skutecznie infekowane. **Celem tego projektu jest analiza funkcji niezbadanych dotąd genów reprezentacyjnego bakteriofaga z rodzaju *Kayvirus*, poznanie mechanizmów umożliwiających kaywirusom przełamywanie bakteryjnych systemów obrony przed bakteriofagami, a także identyfikacja cech genetycznych gronkowca złocistego determinujących wrażliwość lub oporność szczepów tej bakterii na infekcje kaywirusami.** Nasze poprzednie badania doprowadziły do ustalenia kompletnej sekwencji genomów siedmiu bakteriofagów rodzaju *Kayvirus*, określenia specyficzności tych bakteriofagów wobec różnych szczepów gronkowca złocistego, oraz opracowania metody badania ich efektywności terapeutycznej w leczeniu zakażeń gronkowcowych z wykorzystaniem infekcji gronkowcowych nicieni jako systemu modelowego. W ramach proponowanego projektu wykorzystamy nową metodę konstrukcji pochodnych badanego bakteriofaga pozbawionych funkcji pojedynczych z około 60 wybranych do analizy genów. Będziemy badać właściwości otrzymanych defektywnych fagów: ich rozwój i adsorpcję do komórek gospodarza, zdolność do infekcji komórek różnych szczepów gronkowca i do destrukcji biofilmu gronkowcowego, a także do leczenia nicieni zainfekowanych śmiertelną dawką gronkowca złocistego. Dodatkowo wybrane do badań geny będą wprowadzane do komórek gronkowca, celem sprawdzenia czy i jak zmieniają one właściwości bakterii. Wykorzystamy mikroskopię fluorescencyjną oraz mikroskopię elektronową, odpowiednio do określenia lokalizacji badanych białek bakteriofaga w komórkach gronkowca oraz do określenia wpływu braku badanych genów na rozwój i cechy bakteriofagów. Oddzielnym celem projektu jest identyfikacja białek badanych bakteriofagów pozwalających na uniknięcie destrukcji fagowego DNA przez mechanizmy ochronne bakterii. Geny gronkowca złocistego chroniące szczepy tej bakterii przed infekcją przez niektóre fagi z rodzaju *Kayvirus* będą z kolei identyfikowane poprzez analizę porównawczą genomów szczepów wrażliwych i opornych na infekcję. **W świetle narastającego problemu lekooporności bakterii, badania nad czynnikami antybakteryjnymi, których działanie obejmuje szczepy odporne na antybiotyki mają kluczowe znaczenie dla rozwoju systemu ochrony zdrowia ludzi i zwierząt. Proponowany projekt dostarczy przełomowych danych dotyczących kaywirusów - bakteriofagów najsukuteczniejszych spośród dotąd poznanych w zwalczaniu zakażeń gronkowcowych.** Pozwoli na określenie znaczenia niezbadanych dotąd genów tych bakteriofagów m. in. dla wydajności i czasu namnażania bakteriofaga, skuteczności infekcji komórek gronkowca, unikania mechanizmów ochrony komórek gronkowca przed bakteriofagami, destrukcji biofilmu gronkowcowego i efektywności terapeutycznej kaywirusów. Ważnym efektem projektu będzie identyfikacja w genomach szczepów gronkowca złocistego genów odpowiedzialnych za wrażliwość na infekcję bakteriofagami z rodzaju *Kayvirus*, a także genów odpowiedzialnych za niewrażliwość na konkretne kaywirusy u nielicznych szczepów opornych. Może to pomóc w przyszłym wyborze konkretnych bakteriofagów rodzaju *Kayvirus* do tzw. terapii spersonalizowanych, na podstawie wyników szybkich metod przesiewowych analiz DNA infekujących szczepów gronkowca złocistego. Dodatkowo, badanie wpływu wybranych genów badanych bakteriofagów na komórki gronkowca złocistego pozwoli na weryfikację, czy ich produkty nie wpływają na chorobotwórczość tej bakterii - pytanie kluczowe dla oceny bezpieczeństwa terapii kaywirusami.