

Zastosowanie CRISPRi w poszukiwaniu genów modulujących podatność *Pseudomonas aeruginosa* na działanie antybiotyków

W genomach różnych gatunków bakterii zidentyfikowano geny, których nie można usunąć czy w inny sposób inaktywować. Są to tak zwane geny niezbędne, kodujące elementy procesów biologicznych bezwzględnie koniecznych do przeżycia bakterii. Jak można przewidywać, produkty genów niezbędnych są celem większości leków przeciwbakteryjnych. Przez lata „niezbędność” genów była cechą zero-jedynkową. Gen albo jest niezbędny albo nie. Czy jest jednak możliwe, że pewne geny niezbędne są bardziej niezbędne niż inne? Podejście, polegające na określeniu zależności pomiędzy stopniem wyciszenia genu a zahamowaniem wzrostu komórek, pozwala na oszacowanie stopnia niezbędności danego genu (a w zasadzie jego produktu). Umożliwia to wyszukanie słabych punktów, czyli genów, których nawet niewielkie wyciszenie ma drastyczny wpływ na kondycję komórek bakteryjnych. Produkty takich genów mogłyby być wykorzystane jako cele nowych terapii przeciwbakteryjnych.

W ostatnich latach opracowano technikę CRISPRi, polegającą na kierowaniu nieaktywnego białka dCas9 do wybranego miejsca w genomie przy użyciu krótkiej 20 nukleotydowej sekwencji, wchodzącej w skład tak zwanego kierującego RNA (sgRNA). Wiązanie dCas9 do fragmentu, w który wycelowano, powoduje selektywne wyciszenie tego genu. Poprzez manipulację sekwencją kierującą możliwa jest również regulacja siły wyciszenia. Możliwość wyciszenia prawie każdego genu, regulowany stopień wyciszenia, odwracalność i możliwość zastosowania do równoczesnej analizy wielu genów przy wykorzystaniu złączonych bibliotek sgRNA, sprawiły, że metoda CRISPRi jest w ostatnich latach szeroko stosowana do określania wpływu wyciszenia genów, w tym genów niezbędnych, na kondycję komórek bakteryjnych.

Projekt ten jest multidyscyplinarny i obejmuje badania z zakresu biologii molekularnej i genetyki bakterii wraz z metodami wysokoprzepustowego sekwencjonowania, bioinformatyki i analizy danych oraz syntez chemicznych. W projekcie zaadaptujemy technikę CRISPRi do wykorzystania w analizie genów pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*). Bakteria ta jest oportunistycznym patogenem ludzkim, cechującym się wyjątkowymi zdolnościami adaptacyjnymi i wewnętrzną opornością na działanie antybiotyków, a który wywołuje trudne do leczenia zakażenia szpitalne, szczególnie groźne dla pacjentów z obniżoną odpornością i dla chorych na mukowiscydozę. Wykorzystując CRISPRi sprawdzimy, które geny niezbędne w tej bakterii są najbardziej wrażliwe na wyciszenie. Co więcej, sprawdzimy również czy ta wrażliwość zmienia się, gdy bakterie są wystawione na działanie antybiotyków. W podobny sposób planujemy również ocenić istotność genów nie niezbędnych, ale zaangażowanych w oporność *Pseudomonas aeruginosa* na antybiotyki. Oczekiwany celem tych badań jest identyfikacja genów, których modulacja ekspresji silnie uwrażliwia bakterie na działanie antybiotyków a przez to wskazanie produktów tych genów jako najbardziej obiecujących celów do nowych terapii, w tym terapii skojarzonych.