

Mgr inż. Klementyna Marciniak

Streszczenie rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

Identyfikacja regulatorowych RNA w metycylinoopornym szczepie *Staphylococcus aureus* (MRSA) z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (Term-seq).

Jednymi z najgroźniejszych i najczęstszych przyczyn bakteryjnych zakażeń szpitalnych są metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (MRSA). Zdolność bakterii do szybkiej adaptacji sprawia, że pomimo dostępności antybiotyków nowej generacji tj. deptomycyny, wankomycyny i linezolidu, nieustannie pojawiają się kolejne izolaty MRSA dla których nie ma skutecznej metody leczenia. Z tego względu istotne jest poszukiwanie nowych metod zwalczania szczepów antybiotykoopornych, opartych na nowych mechanizmach działania. Jednym z najbardziej obiecujących celów w opracowywaniu alternatywnych terapii przeciw szczepom bakterii lekoopornych są mechanizmy regulatorowe RNA, takie jak atenuacja czy ryboprzełączniki. Zasada ich działania opiera się o zmiany strukturalne funkcjonalnych rejonów RNA, takich jak miejsce wiązania rybosomu (RBS) czy spinki terminacyjne. W ostatnich latach wykazano, że w odpowiedzi na stres antybiotykowy w bakteriach następują liczne zmiany w ekspresji niekodujących RNA.

Niniejsza praca jest próbą wglądu w mechanizmy regulatorowe zależne od RNA u *Staphylococcus aureus* (MRSA) w trakcie stresu antybiotykowego wankomycyną, poprzez identyfikację kluczowych komponentów sieci regulatorowej RNA - ryboprzełączników. W tym celu wyznaczone zostało stężenie wankomycyny, przy którym zachodzą zauważalne procesy adaptacyjne, a następnie wykonane zostało sekwencjonowanie nowej generacji metodą Term-seq. Z punktu widzenia analizy mechanizmów regulatorowych opartych o zdarzenia terminacji transkrypcji sekwencjonowanie to ma swoje szczególne zastosowanie. Dzięki etapowi ligacji adaptorów do wszystkich naturalnych końców 3' mRNA możliwe jest oznaczenie transkryptów pełnej długości oraz skróconych, powstałych w wyniku działania ryboprzełączników. Wykonana została analiza porównawcza uzyskanego obrazu transkryptomu pochodzącego z hodowli kontrolnej MRSA oraz z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Na podstawie różnic długości transkryptów mapujących do regionów 5'UTR wyselekcjonowano siedem kandydatów na ryboprzełączniki. Dla każdego spośród wybranych regulatorów wykonano predykcję struktury drugorzędowej dla potwierdzenia istotności obserwacji oraz przeanalizowano funkcję genów znajdujących się pod ich kontrolą. W trakcie stresu adaptacyjnego do wankomycyny zidentyfikowano aktywność potencjalnych ryboprzełączników modulujących ekspresją: Transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00167), Cukrowego transportera ABC, białka wiążącego ATP

(SAOUHSC_00175), Podjednostki D kompleksu antyporterowego (SAOUHSC_00886), Kinazy homoseryny (SAOUHSC_01322), Komponentu pierwszego syntazy kwasu antranilowego (SAOUHSC_01366), Dwufunkcyjnej autolizyny (SAOUHSC_02023) oraz Transferazy dimetyloadenozynowej (SAOUHSC_00464). Zgodnie z najnowszą wiedzą wszystkie wskazane geny uwikłane są w powstawanie fenotypu wykazującego obniżoną wrażliwość na wankomycynę.

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono weryfikację biochemiczną dla wskazanych danych przez zastosowanie metody PTT-quant. Podejście to jest skierowane na analizę aktywności transkrypcyjnej genów potencjalnie regulowanych przez ryboprzełączniki, dzięki umożliwieniu bezwzględnego określenia stężeń transkryptów skróconych, jak i pełnej długości. Po zastosowaniu metody PTT-quant, dla czterech spośród siedmiu kandydatów potwierdzono działanie ryboprzełącznika w warunkach stresu wankomycyną. Współczynnik indukcji potencjalnych ryboprzełączników znajdujących się w 5'UTR mRNA stanowił kolejno: 2,01 dla Transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00167); 1,09 dla Podjednostki D kompleksu antyporterowego (SAOUHSC_00886); 3,18 dla Kinazy homoseryny (SAOUHSC_01322) oraz 2,06 dla Transferazy dimetyloadenozynowej (SAOUHSC_00464). Wykonane badania wskazują na zasadność podjęcia dalszych działań mających na celu wykorzystanie wskazanych mechanizmów regulatorowych jako nowych celów w opracowywaniu alternatywnych terapii antybiotykowych.