

Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki



mgr Joanna Miskiewicz
nr albumu: 321730

Międzywydziałowe Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie
w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych



Poszukiwanie nowych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach

Rozprawa doktorska
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki fizyczne

Praca wykonana pod kierunkiem:

Prof. dr hab. Joanny Trylskiej

Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski

Prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza

Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski

Warszawa 2024

Podziękowania

Szczególnie dziękuję **prof. dr hab. Joannie Trylskiej** za umożliwienie mi pracy i rozwoju naukowego na wielu płaszczyznach w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych. Za okazaną cierpliwość i wyrozumiałość, poświęcony mi czas, wszelkie wsparcie i pomoc – nie tylko naukową.

Dziękuję śp. **prof. dr hab. Edwardowi Darżynkiewiczowi** za okazaną troskę i pomoc oraz za ogromną życzliwość.

Dziękuję **dr Maciejowi Łukaszewiczowi** oraz **prof. dr hab. Dariuszowi Bartosikowi** za możliwość konsultacji i cenne wskazówki w tematyce biologii molekularnej.

Dziękuję **Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Maszyn Biomolekularnym** za pomoc naukową, pracę w tak wspaniałej atmosferze, wszystkie rozmowy i kawy oraz spędzony razem czas nie tylko w laboratorium.

Bardzo dziękuję moim **Rodzicom** za nieustanne wsparcie, wiarę w moje możliwości i pomoc w realizacji planów.

Dziękuję mojemu **Narzeczonemu** za ogromne wsparcie, otwartość na moje życie naukowe i utrzymywanie mnie w dobrym humorze.

Dziękuję mojemu **Bratu** za zainteresowanie i dobre słowa.

Dziękuję moim **Przyjaciołom** za nieocenione wsparcie, zrozumienie i obecność w moim życiu.

*„Uczony jest w swojej pracowni nie tylko technikiem,
lecz również dzieckiem wpatrzonym w zjawiska przyrody, wzruszające jak czarodziejska baśń.”*

Maria Skłodowska-Curie

Moim Rodzicom

Streszczenie po polsku

Oporność bakterii na antybiotyki stanowi coraz bardziej rozpowszechniający się problem współczesnego świata. Pojawiają się kolejne szczepy wielolekooporne, które skutecznie hamują działania dotychczasowych substancji leczniczych. Zapadalność na infekcje i liczba zgonów nimi spowodowana wciąż rośnie. W związku z tym, zachodzi ogromna potrzeba wprowadzenia nowych, skutecznych terapii przeciwbakteryjnych.

Celem projektu doktorskiego było zbadanie nowych potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych wykorzystujących kwasy nukleinowe i peptydomimetyki. W rozprawie przedstawiono trzy podejścia, które mogą doprowadzić do zahamowania wzrostu bakterii lub dotyczą transportu cząsteczek do wnętrza komórek mikroorganizmów.

Strategia pierwsza wykorzystuje rybozomy - aktywne katalitycznie enzymy RNA. W reakcji transestryfikacji rybozomy hydrolizują wiązania fosfodiesterowe w specyficznych miejscach w sekwencji innych cząsteczek RNA. Zaprojektowano rybozym *hammerhead* oddziałujący z informacyjnym RNA (mRNA) kodującym sekwencję białka przenoszącego grupy acylowe (ACP). ACP będące kofaktorem w biosyntezie kwasów tłuszczowych jest niezbędne bakterii do życia. Hydroliza mRNA kodującego sekwencję białka ACP we właściwym miejscu powinna doprowadzać do zahamowania wzrostu bakterii. Zaprojektowano rybozomy o różnej długości ramion i *in vitro* sprawdzono stabilność ich kompleksów oraz hydrolizę fragmentu mRNA jako substratu. Następnie sekwencje rybozymów zostały umieszczone na plazmidzie i wprowadzone do komórek *E. coli*, w których zaobserwowano działanie katalityczne prowadzące do inhibicji wzrostu. Ponadto, wykazano synergii jednego z rybozymów z antybiotykiem - tetracykliną. Zaprojektowanie i sprawdzenie rybozimu jako enzymu potencjalnie hydrolizującego mRNA w komórkach otwiera drogę do badania katalitycznych RNA jako związków przeciwbakteryjnych lub jako związków pomocniczych.

W strategii drugiej wykorzystywano aktywne błonowo peptydy. Udowodniono, że stabilizacja ich struktury drugorzędowej poprawia ich oddziaływanie z błoną bakterii i zwiększa ich potencjał przeciwbakteryjny. Peptydy, m. in. anoplina, o słabych własnościach przeciwbakteryjnych zostały zmodyfikowane za pomocą specjalnych łańcuchów węglowodorowych. Umożliwiło to stabilizację ich helikalnej struktury aktywnej błonowo, dzięki czemu mogły efektywniej oddziaływać z błonami komórkowymi niż peptydy niezmodyfikowane. Skuteczność poszczególnych peptydomimetyków różniła się w zależności od szczepu bakterii. Szczepy Gram-ujemne wykazały większą wrażliwość na działanie peptydomimetyków bardziej hydrofilowych, zaś Gram-dodatnie – pochodnych hydrofobowych. Wyniki pokazały, że chemiczna stabilizacja aktywnej błonowo struktury drugorzędowej naturalnych peptydów wielokrotnie zwiększa ich aktywność przeciwbakteryjną, często nie powodując jednocześnie hemolityczności.

Trzecia strategia polegała na wykorzystaniu witaminy B₁₂ (cyjanokobalaminy) jako nośnika peptydowego kwasu nukleinowego (PNA) do bakterii *E. coli* i określenia ścieżki tego transportu. PNA to syntetyczny analog DNA, który może działać jako antysensowny oligonukleotyd. Sekwencje PNA mogą zostać zaprojektowane tak, aby wiązały się komplementarnie i blokowały mRNA kluczowe dla życia bakterii. Potrzebują jednak transporterów, gdyż wolne PNA nie jest pobierane przez komórki. Określono szlak transportu koniugatów witaminy B₁₂-PNA do bakterii *E. coli*. Okazuje się, że PNA związane z witaminą B₁₂ jest transportowane poprzez te same receptory w błonie zewnętrznej i wewnętrznej co wolna witamina B₁₂. Otwiera to drogę do użycia tego szlaku transportu przez inne cząsteczki PNA kowalencyjnie podłączone do witaminy B₁₂.

Streszczenie po angielsku

Bacterial resistance to antibiotics is becoming an increasingly widespread problem in the modern world. New multi-drug-resistant strains are emerging, effectively hindering the actions of existing therapeutic agents. The incidence of infections and the number of deaths caused by them continue to rise. Consequently, there is an immense need for the introduction of new, effective antibacterial therapies.

The aim of the doctoral project was to investigate new potential antibacterial strategies using nucleic acids and peptidomimetics. The dissertation presents three approaches that may lead to the inhibition of bacterial growth or involve the transport of molecules into the interior of microbial cells.

The first strategy uses ribozymes - catalytically active RNA enzymes. Ribozymes can hydrolyze phosphodiester bonds at specific sites in the sequence of other RNA molecules. A hammerhead ribozyme was modified to interact with messenger RNA (mRNA) encoding the sequence of acyl carrier protein (ACP). ACP, which is a cofactor in fatty acid biosynthesis, is essential for bacteria to sustain life. Hydrolysis of the mRNA encoding the ACP sequence at the appropriate site should lead to inhibition of bacterial growth. Ribozymes of different arm lengths were designed and the stability of their complexes with an mRNA fragment as a substrate and its hydrolysis were tested *in vitro*. Subsequently, the ribozyme sequences were incorporated on a plasmid and introduced into *E. coli* cells, where the ribozyme catalytic activity leading to growth inhibition was observed. Additionally, synergy between one of the ribozymes and the antibiotic tetracycline was demonstrated. The design and testing of ribozymes as potentially mRNA-hydrolyzing enzymes in cells pave the way for the investigation of catalytic RNAs as antibacterial compounds or adjuncts.

The second strategy involved membrane-active peptides. It was demonstrated that stabilizing their secondary structure improves their interaction with bacterial membranes and enhances their antibacterial potential. Peptides, including anoplin, with weak antibacterial properties, were modified using hydrocarbon stapling technique. This stapling stabilized their helical membrane-active structure, enabling them to interact more effectively with cell membranes than unmodified peptides. The effectiveness of such peptidomimetics varied depending on the bacterial strain. Gram-negative strains showed greater sensitivity to the action of more hydrophilic peptidomimetics, while Gram-positive strains showed sensitivity to hydrophobic derivatives. The results showed that chemical stabilization of the membrane-active structure of natural peptides significantly increased their antibacterial activity, often without causing hemolysis.

The third strategy involved using vitamin B₁₂ (cyanocobalamin) as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) to *E. coli* bacteria and determining the pathway of this transport. PNA is a synthetic DNA analog that can act as an antisense oligonucleotide. PNA sequences can be designed to bind complementarily and block mRNA essential for bacterial life. However, they need transporters, as free PNA is not taken up by cells. The transport pathway of vitamin B₁₂-PNA conjugates to *E. coli* bacteria was determined. It turned out that PNA bound to vitamin B₁₂ is transported through the same receptors in the outer and inner membranes as free vitamin B₁₂. This opens the way for the use of this transport pathway by other PNA molecules covalently attached to vitamin B₁₂.

Granty i udział w projektach

Finansowanie badań

- ❖ Grant PRELUDIUM (2020/37/N/NZ1/03987, kierownik: mgr **Joanna Miszkiewicz**) Narodowe Centrum Nauki: „Potencjalna strategia przeciwbakteryjna oparta na rybozymie” (2020-2023)
- ❖ Grant OPUS (2020/37/B/NZ1/02904, kierownik: prof. dr hab. Joanna Trylska) Narodowe Centrum Nauki: „Wykorzystanie systemów transportu sideroforów do wprowadzania peptydowych kwasów nukleinowych do komórek bakterii” (2023)
- ❖ Grant SONATA (2019/35/D/NZ1/01957, kierownik: dr Monika Wojciechowska) Narodowe Centrum Nauki: „Koniugaty aminoglikozydów z peptydami amfipatycznymi jako środki przeciwbakteryjne” (2020-2021)
- ❖ Grant PRELUDIUM (2017/27/N/NZ1/00986, kierownik: dr Tomasz Pieńko) Narodowe Centrum Nauki: „Poszukiwanie mechanizmu transportu koniugatów witaminy B₁₂ i peptydowych kwasów nukleinowych do komórek bakterii *E. coli*” (2020-2021)
- ❖ Grant MINIATURA (2019/03/X/NZ1/00077, kierownik: dr Monika Wojciechowska) Narodowe Centrum Nauki: „Badanie zależności struktura-aktywność biologicznie aktywnych peptydów w interakcji z błonami bakteryjnymi” (2020)
- ❖ Grant obliczeniowy (GB74-7, kierownik: mgr **Joanna Miszkiewicz**), Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego UW: „Rekonstrukcja eksperymentalnej krzywej topnienia dupleksów RNA metodą dynamiki molekularnej” (2018-2019)

Udział w innych projektach

- ❖ Grant INTER (33/UD/SKILLS/2015, kierownik: dr Maciej Jasiński) Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej: „Dlaczego gorąca woda zamarza szybciej niż zimna? Wykorzystanie sorbetu w fizyce i Efektu Mpemby w technologii żywienia” (2015-2017)

Upowszechnianie wyników

Publikacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej

1. Pieńko T[#], **Miszkiewicz J[#]**, Trylska J, Transport route of vitamin B₁₂-PNA conjugates to *E. coli* cells, [#]równy wkład – w przygotowaniu
2. **Miszkiewicz J**, Maximova K, Łukaszewicz M, Bartosik D, Darżynkiewicz E, Trylska J, Inhibition of bacterial growth by the hammerhead ribozyme directed against mRNA of an essential *Escherichia coli* gene (2024) – w recenzji w czasopiśmie *RNA*
3. Macyszyn J, Chyży P, Burmistrz M, Lobka M, **Miszkiewicz J**, Wojciechowska J, Trylska J, Structural dynamics influences the antibacterial activity of a cell-penetrating peptide (KFF)₃K, (2023) *Sci. Rep.*, 13, 14826
4. Wojciechowska M, Macyszyn J, **Miszkiewicz J**, Grzela R, Trylska J, Stapled anoplin as an antibacterial agent, (2021) *Front. Microbiol.*, 15:1331021
5. Wojciechowska M, **Miszkiewicz J**, Trylska J, Conformational changes of anoplin, W-MreB₁₋₉ and (KFF)₃K peptides in proximity to membrane environments, (2020) *Int. J. Mol. Sci.*, 21:9672
6. Wojciechowska M, Równicki M, Mieczkowski A, **Miszkiewicz J**, Trylska J, Antibacterial Peptide Nucleic Acids - Facts and Perspectives, (2020) *Molecules* 25(3), 559
7. Jasiński M, **Miszkiewicz J**, Feig M, Trylska J, Thermal Stability of Peptide Nucleic Acid Complexes, (2019) *J. Phys. Chem. B* 123, 39, 8168-8177

Inne publikacje

1. Dobieżyńska A, **Miszkiewicz J**, Darżynkiewicz ZM, Tyras M, Stankiewicz-Drogoń A, Trylska J, Darżynkiewicz E, Grzela R, Development of bis-ANS-based modified fluorescence titration assay for IFIT/RNA studies, (2020) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533, 3, 391-396
2. Miedziak B, Dobieżyńska A, Darżynkiewicz ZB, Bartkowska J, **Miszkiewicz J**, Kowalska J, Warminski M, Tyras M, Trylska J, Jemielity J, Darżynkiewicz E, Grzela R, Kinetic analysis of IFIT1 and IFIT5 interaction with different native and engineered RNAs and its consequences for designing mRNA-based therapeutics, (2020) *RNA* 26(1), 58-68

Konferencje, na których zaprezentowano wyniki związane z pracą doktorską

1. 18th Congress of the Polish Biophysical Society, Warszawa, Polska, wrzesień 2022: *Designed ribozyme directed against essential bacterial messenger RNA* - prezentacja ustna
2. EMBO Workshop, RNA structure meets function, Åkersberga, Szwecja, czerwiec 2022, *An RNA enzyme as a potential antibacterials* - plakat
3. 2nd Women in Bioinformatics & Data Science Latin America Conference, wrzesień 2021, online, *Simulations of peptide nucleic acid complexes with RNA* – plakat z nagraniem
4. XXVIII Young Research Fellow Meeting 2021, Société de Chimie Thérapeutique, online, luty 2021, *Designed RNA enzyme as a potential antibacterial* - prezentacja ustna
5. 21st Session of High Power Computer Users ICM, online, luty 2021, *Reconstruction of the experimental melting curve of RNA duplexes using the molecular dynamics method* - prezentacja ustna
6. 60th Anniversary Meeting of the British Biophysical Society, online, wrzesień 2020, *An RNA enzyme as a potential antibacterials* – flash plakat
7. First Virtual Conference of the Ochota Campus, Warszawa, Polska, styczeń 2020, *RNA enzyme as a potential antibacterials* - plakat
8. 2nd Annual CeNT retreat, Centre of New Technologies, University of Warsaw, Warszawa, Polska, grudzień 2019, *Designed hammerhead ribozyme as a potential antibacterials* - plakat
9. 7th Central European Congress of Life Sciences EuroBiotech, Kraków, Polska, wrzesień 2019, *Designed hammerhead ribozyme as a potential antibacterials* - plakat
10. EUROPIN Summer School on Drug Design, Wiedeń, Austria, wrzesień 2019, *Designed RNA enzyme directed against bacterial mRNA* - plakat
11. Gordon Research Conference, DNA and RNA Transactions at Atomic to Organismal Scale, Newry, ME, USA, czerwiec 2019, *Designed RNA enzyme as a potential antibacterials* - plakat
12. Gordon Research Seminar, From Organization and Regulation to Structure and Mechanisms of Nucleic Acid Biology, Newry, ME, USA, czerwiec 2019, *Designed RNA enzyme as a potential antibacterials* - prezentacja ustna
13. The CCP5 Summer School 2018, Lancaster, Wielka Brytania, lipiec 2018, *The cleavage of bacterial mRNA by designed hammerhead ribozyme* - plakat
14. EMBO Workshop, RNA structure meets function, Åkersberga, Szwecja, lipiec 2018, *The cleavage of bacterial RNA by designed hammerhead* – Travel Grant, plakat
15. 6th Central European Congress of Life Sciences EuroBiotech, Kraków, Polska, wrzesień 2017, *The cleavage of bacterial mRNA by a hammerhead ribozyme* - plakat
16. Biomolecules and Nanostructures 6, Podlesice, Polska, maj 2017, *The scission of bacterial RNA by designed hammerhead ribozyme* - plakat

Konferencje z biernym udziałem

1. BioSolveIT DrugSpace Symposium Spring 2021, online, kwiecień 2021
2. Super Computing Frontiers Europe 2020, online, marzec 2020
3. Faculty Retreat, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, MI, USA, maj 2019
4. Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology, Warszawa, Polska, kwiecień 2019
5. Super Computing Frontiers Europe 2019, Warszawa, Polska, marzec 2019
6. International Scientific Symposium - Challenges of modern molecular biology, biophysics and biomedicine, The Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Science, Warszawa, Polska, wrzesień 2015
7. 8th EMBO Young Scientists Forum, the Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa, Polska, lipiec 2015
8. 9th EBSA European Biophysics Congress, Lisbona, Portugalia, lipiec 2013

Spis treści

Podziękowania	3
Streszczenie po polsku	7
Streszczenie po angielsku.....	8
Granty i udział w projektach	9
Finansowanie badań	9
Udział w innych projektach	9
Upowszechnianie wyników	10
Publikacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej	10
Inne publikacje	10
Konferencje, na których zaprezentowano wyniki związane z pracą doktorską	11
Konferencje z biernym udziałem.....	12
1 Wprowadzenie	17
1.1 Antybiotyki i problem antybiotykooporności	17
1.2 Cele pracy.....	18
1.2.1 Cele ogólne.....	18
1.2.2 Cele szczegółowe.....	19
2 Metody doświadczalne biofizyki i biologii molekularnej	20
2.1 Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne	20
2.2 Elektroforeza żelowa.....	22
2.3 Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS (pomiar absorbancji, temperatury topnienia)	23
2.4 Spektroskopia fluorescencyjna	27
2.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR	28
2.6 Klonowanie molekularne	28
2.7 Transformacja wektorowa metodą szoku cieplnego	30
2.8 Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR)	30
2.9 Badanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii.....	32
2.10 Redukcyjny test resazury.....	34
3 Metody statystyczne	35
3.1 Średnia, błąd standardowy średniej i odchylenie standardowe	35
3.2 Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA)	35
3.3 Regresja liniowa	37
4 Przeciwbakteryjna aktywność rybozomu <i>hammerhead</i>	38
4.1 Wstęp	38

4.1.1	<i>Escherichia coli</i> jednym z największych zagrożeń bakteryjnych.....	38
4.1.2	Kwasy rybonukleinowe.....	38
4.1.3	Rybozomy.....	39
4.1.4	Reakcje katalityczne przeprowadzane przez rybozomy	40
4.1.5	Aktywność katalityczna rybozomów <i>in cis</i> i <i>in trans</i>	41
4.1.6	Terapeutyczny potencjał rybozomów.....	42
4.1.7	Rybozym hammerhead.....	43
4.1.8	Rybozomy jako potencjalne środki przeciwbakteryjne	45
4.1.9	Zalety i wady rybozomów w kontekście ich potencjalnego użycia w terapiach przeciwbakteryjnych.....	46
4.1.10	Plazmidy bakteryjne	47
4.1.11	Kontrolowana ekspresja genów operonu <i>lac</i> przy użyciu polimerazy T7 RNA.....	47
4.2	Materiały i metody	48
4.2.1	Przewidywanie i wizualizacja struktur kwasów nukleinowych <i>in silico</i>	48
4.2.2	Stężenia oligonukleotydów RNA.....	48
4.2.3	Weryfikacja formowania się kompleksów RNA <i>in vitro</i> metodą izotermicznej kalorymetrii miareczkującej (ITC)	48
4.2.4	Cięcie substratu RNA przez rybozomy na drodze reakcji transestryfikacji <i>in vitro</i>	48
4.2.5	Rozdział cząsteczek RNA po trawieniu metodą elektroforezy żelowej pionowej	48
4.2.6	Projektowanie plazmidu z systemami z rybozymem.....	49
4.2.7	Szczepy bakterii i przygotowanie komórek kompetentnych.....	49
4.2.8	Transformacja komórek kompetentnych	49
4.2.9	Hodowla bakterii i badanie aktywności rybozomu <i>in vivo</i>	50
4.2.10	Pomiar poziomu mRNA _{acpP} za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)	51
4.2.11	Synergia rybozomu z tetracykliną.....	51
4.2.12	Porównanie docelowej sekwencji cięcia rybozomu w szczepach patogennych.....	51
4.2.13	Analiza statystyczna.....	51
4.3	Wyniki	52
4.3.1	Rybozym <i>hammerhead</i> i miejsca cięcia na wybranych substratach mRNA	52
4.3.2	Zaprojektowane warianty rybozomu i ich kompleksy z substratem <i>in silico</i>	53
4.3.3	Formowanie się kompleksów substrat:rybozym <i>in vitro</i>	55
4.3.4	Cięcie substratów RNA przez zaprojektowane warianty rybozomu <i>in vitro</i> i weryfikacja produktów trawienia	56
4.3.5	Kasety zawierające rybozym na plazmidzie pUC57(Kan)	63
4.3.6	Aktywność rybozomu w pożywce LB w szklanych probówkach	66
4.3.7	Aktywność rybozomu w pożywce MHB w szklanych probówkach.....	68

4.3.8	Aktywność rybozemu w pożywce Davisa w szklanych probówkach	70
4.3.9	Aktywność rybozemu w pożywce MHB i Davis – ostatnie godziny	71
4.3.10	Aktywność rybozemu w pożywce MHB w mikropłytkę – 10 godzin	72
4.3.11	Aktywność rybozemu w pożywce MHB w mikropłytkę – 24 godziny	74
4.3.12	Aktywność rybozemu w pożywce Davisa w mikropłytkę przez 24 godzin hodowli	74
4.3.13	Aktywność rybozemu w pożywce MHB i Davisa – ostatnie godziny	75
4.3.14	Niekontrolowana ekspresja $Rz_{długi}$ w pożywce MHB bez IPTG	76
4.3.15	Weryfikacja produktów cięcia mRNA _{acpP} <i>in vivo</i>	77
4.3.16	Porównanie sekwencji substratu szczepu <i>E. coli</i> BL21(DE3) i szczepów patogennych <i>E. coli</i>	79
4.3.17	Aktywność rybozymów w obecności tetracykliny	80
4.4	Dyskusja	81
4.5	Podsumowanie	83
5	Przeciwbakteryjne działanie peptydów i peptydomimetyków	84
5.1	Wstęp	84
5.1.1	Budowa ściany komórkowej bakterii	84
5.1.2	Peptydy przeciwdrobnoustrojowe i penetrujące komórkę	85
5.1.3	Zalety i wady peptydów w kontekście ich potencjalnego użycia w terapiach przeciwbakteryjnych	86
5.1.4	„Zszywanie” peptydów	87
5.2	Materiały i metody	87
5.2.1	Peptydy przeciwbakteryjne: anoplina, W-MreB ₁₋₉ i peptyd penetrujący komórkę (KFF) ₃ K	87
5.2.2	„Zszyte” pochodne anopliny	88
5.2.3	Szczepy bakterii	89
5.2.4	Hodowla bakterii	89
5.2.5	Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii	90
5.2.6	Monitorowanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii przez anoplinę, W-MreB ₁₋₉ i (KFF) ₃ K	90
5.2.7	Monitorowanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii przez anoplin i jego „zszyte” pochodne	90
5.2.8	Analiza statystyczna	90
5.3	Wyniki	91
5.3.1	Hamowanie wzrostu szczepów <i>E. coli</i> przez peptydy i antybiotyki kontrolne	91
5.3.2	Minimalne stężenie hamujące peptydów: (KFF) ₃ K, anopliny, W-MreB ₁₋₉ oraz antybiotyków kontrolnych na szczepach <i>E. coli</i> K-12 i BL21(DE3)	92
5.3.3	Minimalne stężenie hamujące peptydu anopliny, jego „zszytych” pochodnych oraz antybiotyków kontrolnych na szczepach bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich.	93

5.4	Dyskusja.....	102
5.5	Podsumowanie części II.....	104
6	Transport koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z witaminą B ₁₂ lub peptydem (KFF) ₃ K do komórek <i>Escherichia coli</i>	105
6.1	Wstęp.....	105
6.1.1	Peptydowy kwas nukleinowy	105
6.1.2	Ścieżka transportu witaminy B ₁₂ w <i>Escherichia coli</i>	106
6.1.3	Białko czerwonej fluorescencji	107
6.2	Materiały i metody	108
6.2.1	Konstrukcja plazmidu z genem <i>mrfp1</i> i opornością na gentamycynę	108
6.2.2	Transformacja plazmidu do bakterii pomocniczych	109
6.2.3	Weryfikacja skonstruowanego plazmidu.....	109
6.2.4	Koniugaty PNA z witaminą B ₁₂ lub peptydem (KFF) ₃ K	109
6.2.5	Szczepy bakterii	110
6.2.6	Przygotowywanie i transformacja komórek kompetentnych	111
6.2.7	Przygotowanie komórek do banku bakterii.....	111
6.2.8	Hodowla bakterii	111
6.2.9	Przygotowanie rozcieńczeń na mikropłytkce	111
6.2.10	Monitorowanie transportu PNA komórek bakteryjnych oraz poziomu intensywności białka czerwonej fluorescencji (RFP)	112
6.2.11	Badanie temperatur topnienia koniugatów PNA z witaminą B ₁₂ i peptydem (KFF) ₃ K	112
6.2.12	Analiza statystyczna.....	112
6.3	Wyniki	112
6.3.1	Plazmid z genem białka czerwonej fluorescencji <i>mrfp1</i>	112
6.3.2	Temperatury topnienia PNA i ich koniugatów z witaminą B ₁₂ i peptydem (KFF) ₃ K.....	114
6.3.3	Wzrost mutantów i fluorescencja RFP.....	115
6.3.4	Wzrost bakterii w środowisku PNA i jego koniugatów nośnikami	116
6.3.5	Poziom fluorescencji białka RFP uzyskanych transformantów w środowisku PNA i jego koniugatów z peptydem (KFF) ₃ K i witaminą B ₁₂	117
6.4	Dyskusja	119
6.5	Podsumowanie części III	120
7	Podsumowanie pracy	121
	Bibliografia.....	123

1 Wprowadzenie

1.1 Antybiotyki i problem antybiotykooporności

Staroegipski dokument medyczny datowany na około 1550 r. p.n.e, zwany Papirusem Ebersa, donosi o efektywnym stosowaniu pleśni przy zakażeniach bakteryjnych. Dokładniej, spleśniały chleb był bardzo skuteczny w leczeniu otwartych, ropiejących ran. Praktyka ta miała miejsce nie tylko w Egipcie, ale również w Grecji i Chinach (1). Mimo ówczesnego braku wiedzy i dokładnej identyfikacji przyczyn infekcji, już wtedy mogły być one skutecznie hamowane. Z biegiem czasu doszło do rozpoznania czynników chorobotwórczych i leczniczych. W latach 70. XVII wieku holenderski przyrodnik zwany „ojcem mikrobiologii” Antoni van Leeuwenhoek po raz pierwszy zidentyfikował bakterie (2). W następnych wiekach zaobserwowano jednoznaczłą korelację między bakteriami i powodowanymi przez nie chorobami. Zaczęto szukać substancji, które skutecznie hamowałyby wzrost patogenów (3).

Paul Ehrlich, niemiecki chemik i bakteriolog, nie tylko badał odkrywane substancje lecznicze i toksyczne, ale również je modyfikował. Rozpoczął nawet syntezę nowych, licznych struktur chemicznych. Zabiegi te miały na celu otrzymanie bezpieczniejszych, potencjalnych terapeutów. W 1904 roku rozpoczął farmaceutyczne badania przesiewowe na dużą skalę. Był szczególnie skupiony na znalezieniu leku przeciwko kile wywołanej krętkiem bladym (*Treponema pallidum*). W 1909 roku odkrył arsfenaminę (salwarsan), arsenoorganiczny związek chemiczny jako pierwszy skuteczny w zwalczaniu *T. pallidum*. Niestety, w 1924 roku pojawiły się pierwsze doniesienia o oporności bakterii na salwarsan stosowany u pacjentów (3,4). W latach 40. XX wieku salwarsan został całkowicie wyparty przez antybiotyki, zwłaszcza penicylinę wyziolowaną z pleśni w 1928 roku w laboratorium szkockiego bakteriologa i lekarza Alexandra Fleminga. Od 1942 roku rozpoczęto jej stosowanie na masową skalę, co zaskutkowało pojawieniem się opornego gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) w roku 1947 (3,5,6). Złota era antybiotyków przypadająca na lata 1940-1970 spowodowała znaczne zmniejszenie śmiertelności na skutek infekcji bakteryjnych. W tym czasie patogeny stopniowo uzyskiwały oporność na odkrywane środki przeciwdrobnoustrojowe. Nie stanowiło to jednak większego problemu z powodu nieustającego napływu nowych leków (3,5). Jednak z biegiem czasu coraz więcej bakterii zaczęło wykazywać oporność na kolejne terapeutyki. Przed rokiem 1990 zaczęto obserwować tzw. „lukę odkrywczą”, w której nie odnotowano pojawienia się nowych klas antybiotyków (7). W 2019 roku około 1,3 miliona zgonów było spowodowanych bezpośrednio przez bakterie oporne na antybiotyki, a około 5 milionów pośrednio związanych z ich opornością. Zgonów na skutek infekcji bakteryjnych było około 1,5 raza więcej niż śmierci spowodowanych zakażeniem wirusem HIV i dwukrotnie więcej niż zgonów z powodu malarii (8).

Liczba szczepów bakterii niewrażliwych na antybiotyki nieustannie rośnie, a skuteczność istniejących terapeutów spada. W związku z tym, wprowadzenie na rynek nowatorskich, skutecznych środków przeciwbakteryjnych stanowi nagłą potrzebę współczesnego świata. Jeśli problem nie zostanie odpowiednio rozwiązany to infekcje bakteryjne mogą powodować śmierć nawet 10 milionów ludzi rocznie do roku 2050 (9).

1.2 Cele pracy

1.2.1 Cele ogólne

Celem prezentowanej rozprawy doktorskiej było znalezienie **nowych potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach** (Tabela 1).

1. Strategia pierwsza wykorzystuje katalityczną cząsteczkę RNA – rybozym *hammerhead* do przecięcia bakteryjnej nici mRNA w wyniku reakcji transestryfikacji. Celem było zablokowanie translacji mRNA niosącego informację o białku przenoszącym grupy acylowe (ACP). W związku z tym, że ACP jest niezbędne bakterii do życia, przez udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych, postawiono hipotezę, że jego brak doprowadzi do zahamowania wzrostu komórek *Escherichia coli*.

2. W drugim podejściu zastosowano peptydy wchodzące w interakcje z błoną komórkową lub przenikające do wnętrza bakterii oraz ich pochodne (peptydomimetyki) w celu przerywania ciągłości błon komórkowych i zahamowania wzrostu bakterii. Postawiono hipotezę, że stabilizacja aktywnej błonowo struktury helikalnej tych peptydomimetyków poprawi ich aktywność przeciwbakteryjną.

3. Trzecia taktyka opiera się na poszukiwaniu transporterów antysensownych oligonukleotydów do komórki bakterii. Wykorzystano koniugaty peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) z witaminą B₁₂ jako nośnikiem. Założono, że taki koniugat może zostać wprowadzony do wnętrza komórki ścieżką transportu dedykowaną samej witaminie B₁₂. Celem było sprawdzenie tej hipotezy poprzez badania na komórkach *E. coli* z wprowadzonym plazmidem kodującym białko czerwonej fluorescencji oraz z usuniętymi pojedynczo receptorami białkowymi w błonie zewnętrznej i wewnętrznej. Skutecznie dostarczone PNA powinno utworzyć kompleks z komplementarną sekwencją mRNA i skutkować obniżeniem fluorescencji.

Tabela 1. Podsumowanie zaproponowanych potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych.

L.p.	Cząsteczka	Mechanizm	Wykorzystany szczep
1.	Katalityczne RNA - rybozym <i>hammerhead</i>	Reakcja transestryfikacji mRNA	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)
Oczekiwany wynik Przecięcie mRNA → zablokowanie translacji → brak syntezy białka kluczowego → zahamowanie wzrostu bakterii			
2.	Peptydy i peptydomimetyki (analogi anopliny)	Interakcja helikalnych peptydów z błoną bakterii oraz ich przenikanie do wnętrza komórek	Patogenne i niepatogenne bakterie Gram-ujemne i Gram- dodatnie
Oczekiwany wynik Interakcja z błoną komórkową → Przerwanie ciągłości błony komórkowej → zahamowanie wzrostu bakterii			
3.	Witamina B₁₂	Ścieżka transportu witaminy B ₁₂	<i>Escherichia coli</i> K-12
Oczekiwany wynik Dostarczenie PNA do wnętrza komórki → utworzenie kompleksu PNA z komplementarną sekwencją mRNA → zablokowanie syntezy białka → brak fluorescencji → transport koniugatu PNA z witaminą B₁₂ odbywa się przez tę samą ścieżkę co sama witamina			

1.2.2 Cele szczegółowe

Dla każdej z trzech proponowanych strategii wyznaczono cele szczegółowe oceniane na każdym etapie pracy.

Strategia pierwsza - rybozimy:

1. Wybór trzech substratów mRNA i miejsc cięcia oraz zaprojektowanie odpowiednich rybozymów *hammerhead* zawierających ramiona o różnej długości komplementarne do substratów.
2. Analiza *in vitro* cięcia fragmentów mRNA przez zaprojektowane rybozimy.
3. Opracowanie kaset plazmidowych kodujących sekwencje rybozymów.
4. Sprawdzenie aktywności rybozymów w szczepie *E. coli* BL21(DE3).

Strategia druga – aktywne błonowo peptydy:

1. Sprawdzenie aktywności przeciwbakteryjnej dwóch peptydów przeciwdrobnoustrojowych (anopliny, W-MreB₁₋₉) i peptydu penetrującego ścianę komórkową ((KFF)₃K).
2. Ocena wpływu zmodyfikowanych łańcuchami węglowodorowymi pochodnych peptydu wykazujących stabilną strukturę drugorzędową na hamowanie wzrostu bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich.

Strategia trzecia – ścieżka transportu koniugatów PNA z witaminą B₁₂:

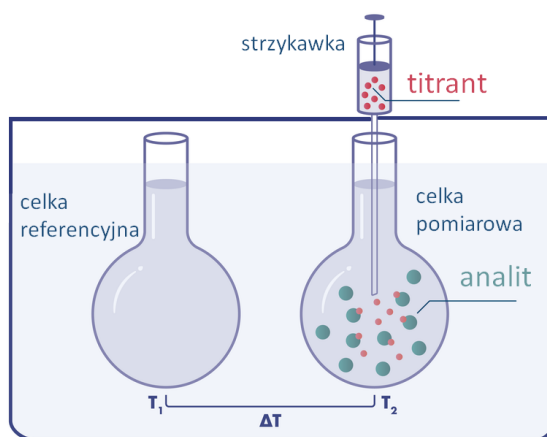
1. Przygotowanie plazmidu z genem białka czerwonej fluorescencji.
2. Wyznaczenie temperatur topnienia dupleksów: PNA z RNA, koniugatu PNA z witaminą B₁₂ z RNA, koniugatu PNA z transportującym peptydem kontrolnym (KFF)₃K z RNA.
3. Analiza skuteczności transportu powyższych koniugatów do komórek *E. coli* i ich mutantów (nie zawierających pojedynczych receptorów w błonie zewnętrznej i wewnętrznej) powiązana z wynikami temperatur topnienia.

2 Metody doświadczalne biofizyki i biologii molekularnej

W tym rozdziale przedstawiono teoretyczne podstawy metod doświadczalnych wykorzystanych w przygotowaniu pracy. Dokładne warunki przeprowadzanych eksperymentów z użyciem wybranych metod znajdują się w dalszych częściach rozprawy dotyczących poszczególnych projektów.

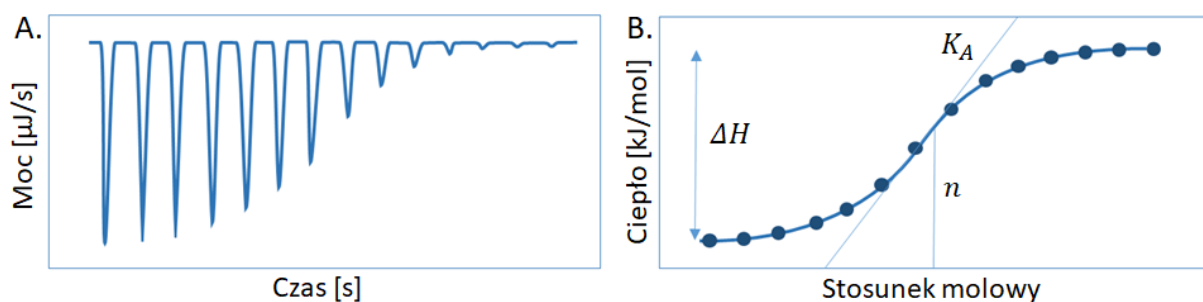
2.1 Izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne

Metoda izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego, ITC (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*) polega na bezpośrednim pomiarze zmian energii wewnętrznej układu zachodzących w czasie wiązania dwóch reagentów. Mierzone jest ciepło wydzielane lub absorbowane podczas reakcji. Kalorymetr ITC składa się ze strzykawki miareczkującej z mieszadełkiem oraz dwóch celk: pomiarowej i referencyjnej znajdujących się w komorze adyabatycznej (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat kalorymetru ITC. Źródło: www.reactionbiology.com

Eksperyment polega na dodawaniu niewielkiej ilości reagentu ze strzykawki (titrant) do reagentu w celce pomiarowej (analit) w równych odstępach czasu. Celka referencyjna zazwyczaj zawiera wodę i utrzymuje stałą temperaturę podczas całego doświadczenia. Umożliwia to określenie czy dana reakcja jest endotermiczna, czy egzotermiczna. Polega to na dostarczeniu odpowiedniej ilości mocy w celu kompensacji różnicy temperatur między celkami. W pierwszych nastrzykach titranta dochodzi do jego szybkiego i całkowitego wiązania się z analitem. Z upływem czasu, miejsca wiązania cząsteczek analitu są wysycane, a ilość ciepła stopniowo się zmniejsza. Na Rysunku 2 przedstawione są: poglądowy termogram (2A) i izoterma (2B). Termogram składa się z serii pików odpowiadających kolejnym nastrzykom titranta, które powinny być oddzielone linią bazową. Pole pod każdym pikiem obliczane jest metoda całkową, a całość przedstawiana w formie izotermy reakcji. Można z niej odczytać zmianę entalpii (ΔH), stechiometrię wiązania (n) i stałą asocjacji (K_A).



Rysunek 2. A. Termogram i **B.** izoterma wiązania reagentów w eksperymencie ITC. Źródło: <https://en.wikipedia.org/>

Ciepło Q_i wydzielane lub absorbowane podczas każdego kolejnego nastrzyku i można zapisać jako:

$$Q_i = V\Delta H\Delta C_i \quad (1)$$

gdzie V to objętość celki pomiarowej, a ΔC_i zmiana stężenia związanych cząsteczek reagentów po nastrzyku i , gdzie w każdym kolejnym kroku zmienia się stężenie titranta.

Zakładając, że analit zawiera tylko jedno ściśle określone miejsce wiązania dla titranta, ciepło q_i można zapisać następująco:

$$Q_i = V\Delta H[A]\left(\frac{K_A[T]_i}{1+K_A[T]_i} - \frac{K_A[T]_{i-1}}{1+K_A[T]_{i-1}}\right) \quad (2)$$

gdzie $[A]$ to stężenie analitu, a $[T]$ stężenie titranta w kroku i lub $i-1$.

Na podstawie danych eksperymentalnych program podaje również inne parametry termodynamiczne: stałą dysocjacji (K_D) oraz zmianę entropii (ΔS). Z otrzymanych wyników można wyliczyć także zmianę energii swobodnej Gibbsa (ΔG).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT\ln K_A \quad (4)$$

gdzie R to stała gazowa wynosząca 8,314 J/mol K.

W niniejszej rozprawie metoda izotermicznego miareczkowania kalometrycznego została zastosowana do badań właściwości termodynamicznych kompleksu titranta i analitu o jednym miejscu wiązania. Jednak technika ITC może być również używana do badań bardziej skomplikowanych układów, tj. gdy analit posiada więcej niż jedno miejsce wiązania danego titranta (10,11). Przeprowadzenie eksperymentów z titrantem konkurującym (T_k), o mniejszym powinowactwie do tych miejsc niż silnie oddziałujący titrant docelowy (T_d), umożliwia dokładniejsze zbadanie wiązania T_d do analitu.

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (12–14).

2.2 Elektroforeza żelowa

Elektroforeza to metoda analityczna służąca rozdzielaniu ruchomych cząsteczek fazy rozproszonej (RNA, DNA, białka) w nieruchomym ośrodku fazy rozpraszającej (żel agarozowy, żel poliakrylamidowy). Pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego cząsteczki migrują w żelu i są rozdzielane ze względu na swój ładunek, wielkość (masę cząsteczkową) i konformację. Wpływ na ich ruchliwość mają również warunki prowadzenia elektroforezy, m. in. różnica przyłożonych potencjałów, pH, siła jonowa, temperatura i opór (lepkość) środowiska (porowatość, usieciowanie żelu). Metoda ta pozwala również na obserwację stopnia degradacji biomolekuł i zanieczyszczenia innymi cząsteczkami.

Molekuła obdarzona ładunkiem q umieszczona w polu elektrycznym E , zostaje wprowadzona w ruch jednostajnie przyspieszony z kulombowską siłą F :

$$F = qE \quad (5)$$

Można przyjąć, że cząsteczka jest kulą o promieniu r , która porusza się z prędkością v . Jej ruchowi przeciwdziałają siły oporu środowiska F_{op} proporcjonalne do lepkości η ośrodka oraz do promienia cząsteczki r , co opisuje wzór Stokes'a (15):

$$F_{op} = 6\pi r \eta v \quad (6)$$

Po zrównoważeniu siły kulombowskiej przez siłę oporu molekuła porusza się ruchem jednostajnym z prędkością:

$$v = \frac{qE}{6\pi r \eta} \quad (7)$$

W związku z tym, że prędkość cząsteczki jest zależna od warunków zewnętrznych, takich jak natężenie prądu E , stosuje się parametr określany jako ruchliwość elektroforetyczna μ opisywana równaniem Hückla (16):

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (8)$$

Ruchliwość cząsteczki, a więc szybkość jej migracji, wzrasta wraz z jej ładunkiem i maleje ze wzrostem jej wielkości, jak również wzrostem lepkości środowiska. W celu ograniczenia wpływu konformacji kwasów nukleinowych na ich migrację w żelach poliakrylamidowych używa się mocznika jako czynnika denaturującego.

Elektroforeza żelowa kwasów nukleinowych przeprowadzana jest na porowatych nośnikach (agaroza, poliakrylamid), które dzięki efektowi sita molekularnego umożliwiają odpowiednią separację cząsteczek. Niewielkie molekuly są w stanie przejść przez mniejsze pory żelu, podczas gdy większe poruszają się wolniej lub pozostają nieruchome. Im niższa procentowość (usieciowanie) żelu, tym większe cząstki są w stanie w nim migrować. Agaroza wykorzystywana jest do większych cząsteczek ze względu na mniejszy stopień usieciowania – od 50 par zasad (pz) na żelach 2% do 30 000 pz na żelach 0,5%. Z kolei poliakrylamid tworzy gęstsze usieciowanie, które pozwala na obserwację od 5 pz na żelach 20% do 2000 pz na żelach 3,5%.

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (17–20).

2.3 Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS (pomiar absorbancji, temperatury topnienia)

Spektroskopia absorpcyjna jest metodą analityczną stosowaną do analizy ilościowej i strukturalnej związków organicznych. Opiera się na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczką posiadającą chromofory (grupy atomów z wiązaniami wielokrotnymi lub pierścieniami aromatycznymi). Na skutek promieniowania zachodzi przejście elektronów między poziomami elektronowymi. Dochodzi do zmiany energii początkowej cząsteczki E_p na energię końcową E_k . Jeśli $E_k > E_p$, to różnica energii $\Delta E > 0$. Wówczas cząsteczka absorbuje promieniowanie co wyraża się w postaci widm absorpcyjnych.

Według postulatu Bohra elektron absorbuje najmniejszą ilość energii, czyli kwant energii (foton). Energia fotonu jest zależna wprost proporcjonalnie od częstotliwości ν , prędkość światła w próżni c i odwrotnie proporcjonalnie do długości fali λ :

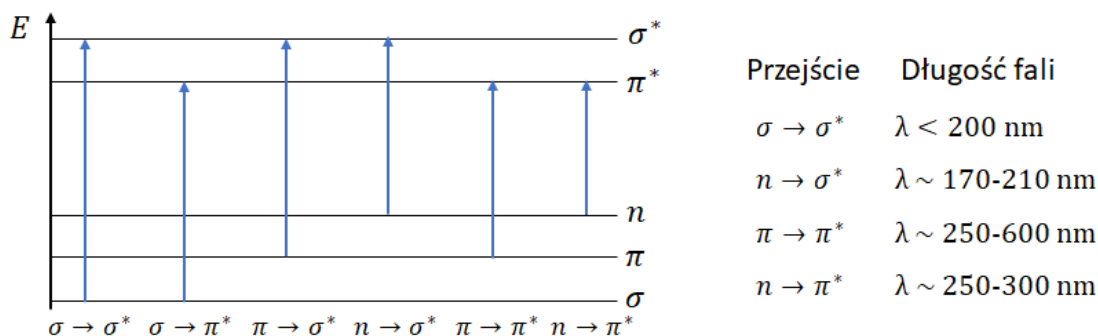
$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (9)$$

Hipoteza Louisa de Broglie'a (21) zakłada, że każdej cząstce o pędzie p może być przypisana fala (dualizm korpuskularno-falowy). De Broglie zaproponował zależność między długością fali λ , a pędem p , która stała się podstawą do powstania mechaniki kwantowej i zdefiniowania funkcji falowej (Ψ).

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (10)$$

gdzie h to stała Planca $6,63 \times 10^{-34}$ J s.

Energię cząsteczki stanowi suma trzech energii składowych: elektronowej E_{el} związanej z konfiguracją elektronową, oscylacyjnej E_{osc} dotyczącej oscylacji zrębów atomowych wokół położenia równowagi oraz rotacyjnej E_{rot} odnoszącej się do rotacji całej cząsteczki. Poziomy elektronowe dzielą się na podpoziomy oscylacyjne, a poziomy oscylacyjne na podpoziomy rotacyjne. Relacja między energiami jest następująca: $E_{el} \gg E_{osc} \gg E_{rot}$. W zakresie nadfioletu (UV) i światła widzialnego (VIS) dochodzi do przejść elektronów z jednego stanu rotacyjnego w danym stanie oscylacyjnym do drugiego stanu rotacyjnego w określonym stanie oscylacyjnym. Promieniowanie UV-VIS o energii 10 eV i zakresie długości fali λ od 10 nm do 770 nm powoduje przejścia elektronów walencyjnych z orbitali (funkcji falowych Ψ) wiążących σ , π i niewiążących n na orbitale antywiążące σ^* , π^* o wyższej energii (Rysunek 3). Kwadraty orbitali (Ψ^2) opisują rozkład gęstości ładunku (prawdopodobieństwa znalezienia elektronu). Przejścia elektronowe powodują zmiany rozkładu gęstości ładunku i zależą od długości fali. Do analizy kwasów nukleinowych stosuje się światło UV, najczęściej o zakresie długości fal od 220 nm do 320 nm. W związku z tym, dochodzi do przejść elektronów z orbitalu n lub π na orbitale σ^* lub π^* . Maksymalna wartość absorpcji wskazuje na długość fali związanej z danym przejściem. W przypadku kwasów nukleinowych maksimum absorpcji znajduje się przy długości fali 260 nm, co wiąże się z przejściami: $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$. Za ich absorpcję odpowiadają pierścienie aromatyczne zasad azotowych.



Rysunek 3. Schemat przejść elektronowych z orbitali wiążących σ, π , niewiążących n na orbitale antywiążące σ^*, π^* z długościami fal dla każdego przejścia. Źródło: (22).

Do pomiaru stężeń cząsteczek w roztworze wykorzystuje się transmitancję, czyli przepuszczalność promieniowania T . Jest to stosunek natężenia światła przechodzącego przez próbkę I do natężenia światła padającego na próbkę I_0 :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (11)$$

Z transmitancji można wyznaczyć absorbancję A :

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (12)$$

Zgodnie z prawem Lamberta-Beera zmierzona absorbancja jest proporcjonalna do: molowego współczynnika absorpcji (ekstynkcji) ε , stężenia próbki c oraz długości drogi optycznej l , zazwyczaj równej 1 cm. Molowy współczynnik ekstynkcji ε można określić jako absorbancję wykazywaną przez roztwór o stężeniu 1 mol/dm³, przy grubości warstwy 1 cm. Jest wyznaczany w konkretnej długości fali λ i zależy od liczby, kolejności i rodzaju zasad azotowych w łańcuchu kwasu nukleinowego.

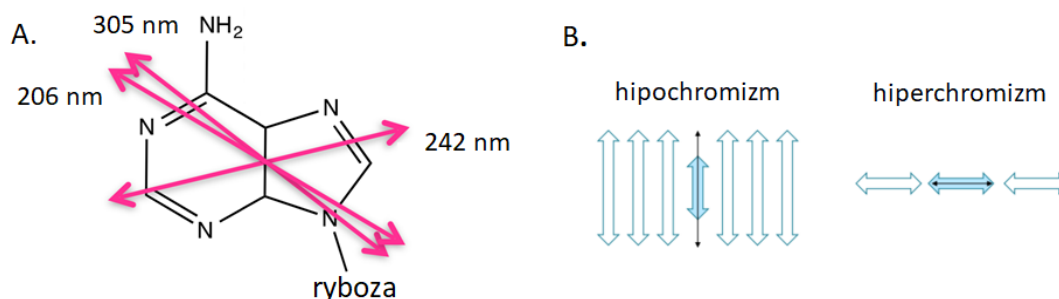
$$A = \varepsilon cl \quad (13)$$

Całkowite promieniowanie pochłanianie przez molekułę stanowi sumę absorpcji pojedynczych zasad azotowych, jak również oddziaływań między nimi. Absorpcja promieniowania jest związana wprost proporcjonalnie ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki μ , który określa, zmiany jakie nastąpiły w gęstości ładunków podczas przejścia elektronu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Dla układu złożonego z dwóch ładunków q o przeciwnych znakach położonych od siebie w odległości r :

$$\mu = qr \quad (14)$$

Kierunek przejścia elektronu jest określany na podstawie przestrzennego rozmieszczenia dipolowego momentu przejścia w cząsteczce (Rysunek 4A). Zasady azotowe charakteryzują się płaską symetrią, dlatego możliwe są tylko przejścia elektronowe równoległe ($\pi \rightarrow \pi^*$) o silniejszej absorpcji i prostopadłe ($n \rightarrow \pi^*$) o słabszej absorpcji. Pomiar absorpcji umożliwia obserwację zmian konformacyjnych kwasów nukleinowych. Pojedyncze nici wykazują większą absorpcję niż helisy. Wiąże się to ze oddziaływaniem zasad azotowych w dupleksach. Takie zmniejszenie pochłaniania promieniowania przez struktury dwuniciowe spowodowane stackingiem nosi nazwę hipochromizmu. Zjawisko to jest związane z dipolowym momentem przejścia indukującym dipole elektryczne w cząsteczkach (Rysunek 4B). Dipol elektryczny posiada końce o przeciwnych ładunkach (pozytywny i negatywny), które z kolei indukują odpowiednio przeciwne sobie ładunki: pozytywny – ujemne,

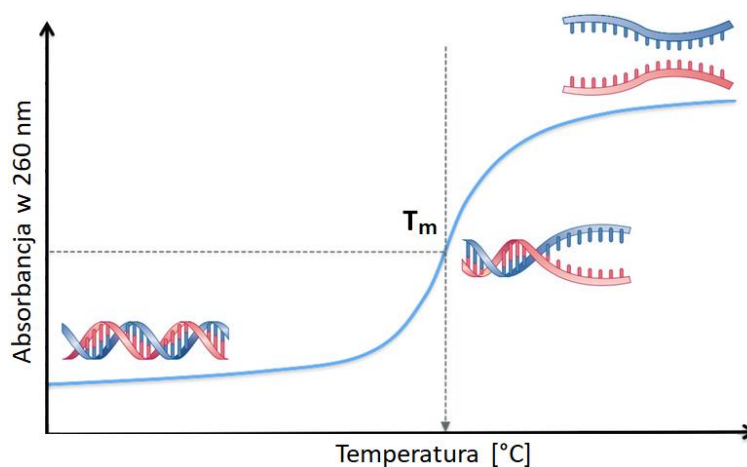
negatywny – dodatnie. W związku z tym, powstałe dipole mają przeciwny kierunek do dipola indukującego, co zmniejsza jego długość. W przypadku, gdy indukowane dipole mają ten sam kierunek co dipol je wywołujący, dochodzi do wzrostu absorpcji, czyli hiperchromizmu. Omawiane zmiany absorpcji obserwowane są podczas splatania i rozplatania nici w kompleksach kwasów nukleinowych.



Rysunek 4. A. Przykładowe kierunki dipolowych momentów przejść elektronowych adenozyiny z odpowiadającymi im długościami fal, dla których występuje maksimum absorpcji. Źródło: https://chemfd.github.io/Photochemistry_2/chAbs.html **B.** Schemat ułożenia indukowanych momentów dipolowych powodujący powstawanie. Schemat ułożenia dipolowych momentu przejść oraz indukowanych momentów dipolowych powodujących powstanie hipochromizmu i hiperchromizmu. Źródło: <https://quizlet.com/>

Temperatury topnienia

Badanie trwałości termodynamicznej kompleksów oparte jest na zmianach temperatury. Wraz z jej wzrostem podwójna helisa ulega denaturacji - wiązania wodorowe pomiędzy podwójną nicią DNA ulegają zerwaniu i dochodzi do ich separacji. W związku z tym, obserwowany jest defekt hipochromizmu. Obniżenie temperatury powoduje redenaturację dupleksu i występowanie efektu hiperchromizmu. Sigmoidalna krzywa absorpcji od temperatury jest nazywana krzywą topnienia. W temperaturach całkowitego splecenia i rozplecenia podwójnej helisy fragmenty krzywej powinny być jak najbardziej płaskie, czyli osiągać tzw. *plateau*. Temperatura topnienia, T_m (ang. *melting temperature*) określa stan, w którym struktury dupleksów wykazują formę jednoniciową i dwuniciową w takiej samej ilości, a na krzywej widnieje jako punkt środkowy między dolnym i górnym *plateau* (Rysunek 5).



Rysunek 5. Schemat krzywej topnienia. Źródło: <https://monde.ccdmd.qc.ca> i www.brainkart.com

Analiza krzywej topnienia oparta na modelu dwufazowym wymaga wyznaczenia dwóch prostych linii bazowych (górnej i dolnej) równoległych do obszarów *plateau*, które oznaczają odpowiednio stan dwuniciowy (*ds*) i jedn niciowy (*ss*). Absorbancja przez pojedyncze nici A_{ss} i dwupleksy A_{ds} w zależności od temperatury T wynosi:

$$A_{ds} = a_{ds}T + b_{ds} \quad (15)$$

$$A_{ss} = a_{ss}T + b_{ss} \quad (16)$$

gdzie a_{ds} , b_{ds} oraz a_{ss} , b_{ss} w to współczynniki prostych wyznaczane za pomocą regresji liniowej.

Frację sparowanych zasad (f) można wyznaczyć za pomocą:

$$f = \frac{A - A_{ss}}{A_{ds} - A_{ss}} \quad (17)$$

gdzie A to absorbancja przy frakcji f . Wówczas absorbancja wynosi:

$$A = fA_{ds} + A_{ss}(1 - f) \quad (18)$$

T_m jest wyznaczana, gdy $f = 0,5$. W celu wyznaczenia parametrów termodynamicznych należy wyznaczyć stężenia stanu jedn niciowego i dwuniciowego. W modelu dwustanowym, w którym jedna nić jest komplementarna do drugiej i nie występują nieoczekiwane sparowane półprodukty stała równowagi K_A wynosi:

$$K_A = \frac{2f}{2(1-f)^2c} \quad (19)$$

Korzystając z równania van't Hoffa (23):

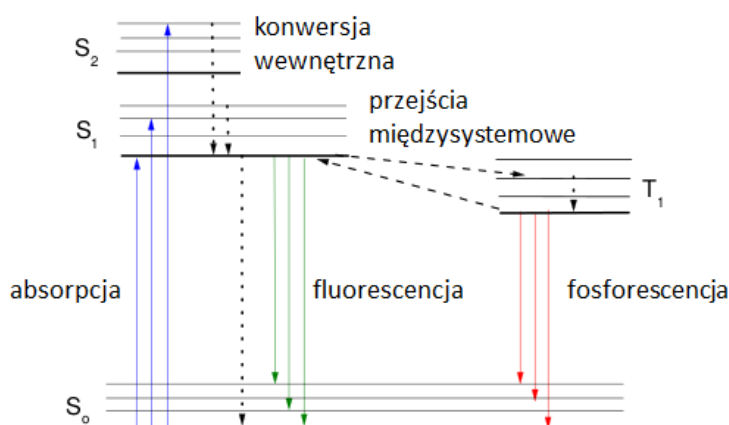
$$\frac{d(\ln K)}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H}{R} \quad (20)$$

oraz równań (3) i (4) opisujących entalpię swobodną ΔG możliwe jest wyznaczenie wartości ΔH , ΔS i ΔG .

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (22,24–30)

2.4 Spektroskopia fluorescencyjna

Spektroskopia fluorescencyjna (spektrofluorymetria) to rodzaj spektroskopii elektromagnetycznej, w której pod wpływem najczęściej światła UV dochodzi do wzbudzenia elektronów walencyjnych ze stanu singletowego podstawowego S_0 do stanu singletowego wzbudzonego S_i (i – numer stanu wzbudzonego). Nadmiar energii może zostać rozproszony w procesach bezpromienistych między stanami o tej samej lub różnej multipletowości, odpowiednio: konwersja wewnętrzna i przejścia międzysystemowe. Energia jest również oddawana na drodze emisji promieniowania ze stanu singletowego wzbudzonego S_1 do podstawowego S_0 (fluorescencja) lub ze stanu trypletowego wzbudzonego T_1 do singletowego podstawowego S_0 (fosforescencja). Procesy te są przedstawiane za pomocą diagramu Jabłońskiego (Rysunek 6).



Rysunek 6. Schemat diagramu Jabłońskiego. Przejścia promieniste: absorpcja, fluorescencja, fosforescencja; przejścia bezpromieniste: konwersja wewnętrzna i przejścia międzysystemowe. S_0 , S_1 , S_2 , T_1 – stany energetyczne elektronów (S – singletowe, T – trypletowe; 0 – stan podstawowy, 1,2 – stany wzbudzone). Źródło: <https://brain.fuw.edu.pl/>

Ze względu na częściową stratę energii ΔE na sposób bezpromienisty, maksimum długości fali emisji fluorescencji λ_{em} będzie zawsze wyższe niż maksimum długości fali wzbudzenia (absorpcji) λ_{ex} . Zjawisko to określa się mianem przesunięcia Stokesa:

$$E = h\nu_{ex} - h\nu_{em} = hc\left(\frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}}\right) \quad (21)$$

gdzie ν_{ex} to częstosliwość fali absorpcji, ν_{em} – częstosliwość fali emisji.

Fluorescencja jest charakteryzowana przez: średni czas życia (τ) określający stałą czasową zaniku fluorescencji po zakończeniu promieniowania wzbudzającego oraz wydajność kwantową (ϕ) opisaną jako stosunek liczby fotonów wyemitowanych do liczby fotonów zaabsorbowanych w procesie promieniowania wzbudzającego. Zanik promieniowania w czasie zachodzi wykładniczo:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right) \quad (22)$$

gdzie I_0 to natężenie fluorescencji po ustaniu promieniowania wzbudzającego, τ_0 – naturalny średni czas życia cząsteczki w stanie wzbudzonym. Ze względu na występowanie procesów bezpromienistych zanik fluorescencji (τ) można opisać:

$$\tau = \frac{1}{\sum_i k_i} \quad (23)$$

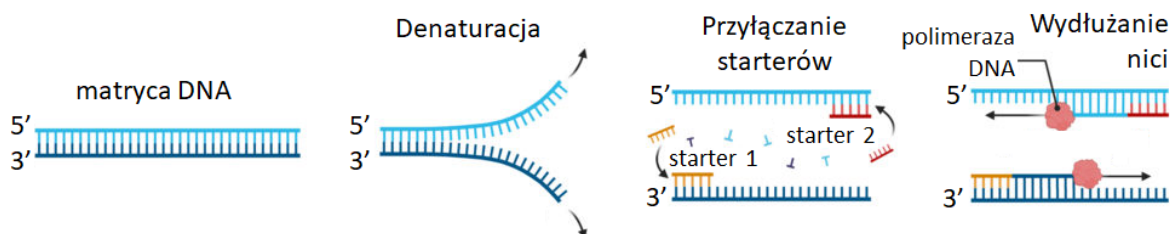
gdzie k_i oznacza stałe szybkości każdego z procesów. Z kolei wydajność kwantowa opisana za pomocą czasów życia cząsteczki wynosi:

$$\varphi = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (24)$$

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (31–34).

2.5 Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy, PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) jest używana do detekcji określonego fragmentu DNA w badanej próbce. W przypadku obecności danej sekwencji dochodzi do jej amplifikacji i wygenerowania nawet milionów jej kopii. Odbyna się to w cyklicznych etapach (Rysunek 7) zachodzących w różnych temperaturach. Najpierw dochodzi do denaturacji nici DNA w wysokiej temperaturze, zazwyczaj 95°C. W kolejnym etapie następuje przyłączenie starterów – specyficznych oligonukleotydów DNA komplementarnych do sekwencji okalających powielany fragment. Temperatura w tej części reakcji jest zależna od temperatury topnienia starterów i nie może być od niej większa. W ostatnim etapie, prowadzonym zwykle w temperaturze 72°C, pożądany odcinek DNA jest wydłużany przez termostabilną polimerazę DNA (35). Wraz ze wzrostem czasu liczba amplifikowanych fragmentów DNA rośnie wykładniczo, jak 2^n , gdzie n oznacza liczbę cykli (36).



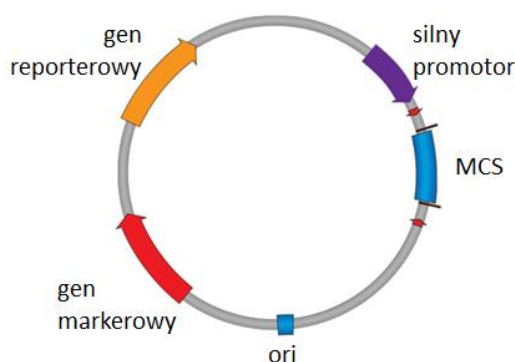
Rysunek 7. Schemat jednego cyklu reakcji PCR. Źródło: <https://esp.labbox.com/>

2.6 Klonowanie molekularne

Klonowanie molekularne to metoda inżynierii genetycznej. Wykorzystywane jest do identyfikacji genów, przeprowadzania ukierunkowanej mutagenazy, modyfikacji organizmów, produkcji białek rekombinowanych oraz replikacji określonego DNA. Pożądany odcinek DNA (wstawka) jest włączany do cząsteczki nośnika, najczęściej wektora plazmidowego, który jest wprowadzany do komórek gospodarza w celu namnożenia i otrzymania dużej liczby identycznych kopii (klonów).

Wybór wektora plazmidowego

Wektor plazmidowy odpowiedni do klonowania powinien zawierać kilka istotnych elementów, takich jak: *origin* (ori) miejsce rozpoczęcia replikacji DNA, silny promotor, zawierający sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA, miejsce do klonowania oraz geny markerowe lub reporterowe (Rysunek 8). Polilinker (miejsce wielokrotnego klonowania), MCS (ang. *Multiple Cloning Site*) posiada wiele miejsc restrykcyjnych, między które można wstawić odpowiedni fragment DNA. Gen markerowy umożliwia odróżnienie bakterii zawierających plazmid od tych bez plazmidu, np. gen oporności na antybiotyki. Gen reporterowy pozwala na oddzielenie bakterii zrekombinowanych, czyli posiadających plazmid ze wstawką, od bakterii niosących plazmid bez wstawki, np. gen β -galaktozydazy lub białka fluorescencyjnego, wpływających na barwę komórek.



Rysunek 8. Schemat wektora plazmidowego do klonowania. ori - miejsce rozpoczęcia replikacji DNA, gen markerowy – gen selekcyjny na obecność plazmidu, np. oporności na antybiotyki, gen reporterowy – gen selekcyjny na obecność wstawki w plazmidzie, silny promotor – miejsce przyłączenia polimerazy RNA, MCS – miejsce do klonowania z wieloma miejscami restrykcyjnymi. Źródło: aboutmolecularbiology.blogspot.com

Przygotowanie wektora i wstawki za pomocą enzymów restrykcyjnych

Enzymy restrykcyjne są endonukleazami rozpoznającymi krótkie (4-8 par zasad), specyficzne, palindromowe sekwencje DNA (37). W obrębie tych sekwencji przeprowadzają hydrolizę wiązań fosfodiesterowych. Aby połączyć wstawkę z wektorem, obydwa fragmenty muszą posiadać te same miejsca restrykcyjne i zostać poddane hydrolizie przez odpowiednie enzymy restrykcyjne (Rysunek 9). Wówczas będzie mogło dojść do zespolenia ich wolnych końców przy pomocy ligazy DNA. Enzym ten tworzy wiązanie fosfodiesterowe między grupą 3'-hydroksylową deoksyrybozy końca jednego odcinka DNA, a grupą 5'-fosforanową końca drugiego odcinka.



Rysunek 9. Schemat klonowania molekularnego. Źródło: <https://www.news-medical.net>

Selekcja plazmidu posiadającego wstawkę

Do selekcji właściwego konstruktu (plazmidu posiadającego wstawkę) dochodzi na podstawie obecności genów oporności na antybiotyki lub genów reporterowych (kodujących np. białka fluorescencyjne). Wtedy, plazmid rekombinowany może zostać wprowadzony do organizmu docelowego, np. szczepu bakterii, na drodze transformacji i namnożony w ich komórkach.

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (38,39).

2.7 Transformacja wektorowa metodą szoku cieplnego

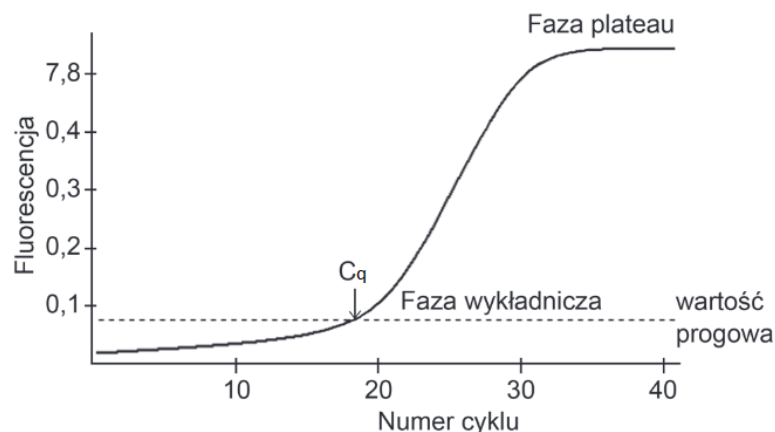
Transformacja wektorowa metodą szoku cieplnego jest jednym ze sposobów wprowadzania DNA plazmidowego do organizmu biorcy. Odbywa się to podczas wspólnej inkubacji bakteryjnych komórek kompetentnych z wektorem. Przez większość czasu znajdują się one w niskiej temperaturze (na lodzie), jednak zostają na krótko umieszczone w temperaturze wyższej, tzw. skok temperaturowy (szok cieplny), i ponownie ułożone na lodzie. Przygotowanie komórek kompetentnych jest niezbędne, aby mogły one pobrać obce DNA. W tym celu stosuje się schłodzony chlorek wapnia (CaCl_2), który ułatwia wiązanie DNA z powierzchnią komórki biorcy. Dzięki temu, po szoku cieplnym, plazmid może dostać się do wnętrza bakterii. Następnie, prowadzona jest hodowla bakterii oraz ich selekcja, aby wyłonić tylko te, które zawierają wprowadzony plazmid. W wyniku transformacji bakterie mogą zyskać dodatkowe geny, np. gen oporności na antybiotyki lub geny różnych białek i być wykorzystane do ich produkcji (40,41).

2.8 Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR)

Jednym z rozszerzeń podstawowej reakcji PCR jest bardzo czuła ilościowa PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time quantitative PCR*) poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji (ang. *Reverse Transcription quantitative PCR*), RT-qPCR. Monitorowany jest przyrost produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym w każdym cyklu reakcji. Do próbki reakcyjnej dodawane jest RNA, które przed rozpoczęciem reakcji zostaje przepisane na DNA przy pomocy enzymu odwrotnej transkryptazy. Technika *Real-Time* PCR wymaga zastosowania reporterowej cząsteczki fluorescencyjnej. Fluoroforem mogą być znakowane sondy wiążące się komplementarnie do określonej sekwencji DNA (np. sondy TaqMan oparte na zjawisku FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) lub substancje interkalujące dwuniciowy DNA bez specyficzności do sekwencji (np. *SYBR Green*). W porównaniu z sondami barwnik *SYBR Green* jest bardzo trwały, emituje silny sygnał po związaniu z DNA, nie inhibuje reakcji PCR, wchodzi w skład mieszaniny reakcyjnej, jest łatwy w użyciu i nie jest drogi. Detekcja produktów amplifikacji oparta *SYBR Green* jest najczęściej stosowanym fluoroforem w RT-PCR.

Reakcja może być przeprowadzona w jednej mieszaninie reakcyjnej, tzw. *one-step*. Cykl termiczny prowadzony tą metodą składa się z kilku etapów. Na początku, reakcja odwrotnej transkrypcji (najczęściej w 50°C), z po niej aktywacja polimerazy i denaturacja DNA (najczęściej w 95°C). Kolejnym etapem jest amplifikacja powtarzana w średnio 35-40 cyklach składająca się z dwóch części: denaturacji DNA w 95°C , przyłączania starterów i wydłużania sekwencji w temperaturze zależnej od ich temperatury topnienia.

Przyrost produktu pojawia się jako krzywa amplifikacji, dzięki obecności fluoroforu (Rysunek 10). Do analizy brane są cykle kwantyfikacji (C_q , ang. *quantification cycle*), w których krzywa przekracza wartość progową detekcji i osiąga *plateau*. Wartość C_q jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia początkowego matrycy (fragment nici DNA lub RNA na podstawie której powielana jest informacja). Im wcześniejszy cykl, w którym pojawi się sygnał, tym więcej kopii DNA otrzymuje się w czasie reakcji.



Rysunek 10. Przykładowa krzywa amplifikacji. C_q – cykl kwantyfikacji. Źródło: (42)

Analizę wartości C_q można przeprowadzić za pomocą względnej (*Relative Quantition*) lub bezwzględnej (*Absolute Quantition*) analizy ilościowej.

Analiza względna – metoda porównawcza

W kwantyfikacji względnej porównywana jest wartość C_q poszukiwanego genu między próbką badaną, a referencyjną próbką kontrolną. Wyznaczane są wartości C_q reakcji amplifikacji genów: poszukiwanego i referencyjnego w próbce badanej i kontrolnej. Gen referencyjny nie podlega zmianom ekspresji, znajduje się we wszystkich komórkach i występuje w nich w tej samej liczbie kopii.

$$\Delta C_q (\text{próbka badana}) = C_q \text{ genu poszukiwanego} - C_q \text{ genu referencyjnego} \quad (25)$$

$$\Delta C_q (\text{próbka kontrolna}) = C_q \text{ genu poszukiwanego} - C_q \text{ genu referencyjnego} \quad (26)$$

Następnie, obliczana jest różnica:

$$\Delta \Delta C_q \text{ między próbkami: } \Delta \Delta C_q = \Delta C_q (\text{próbka badana}) - \Delta C_q (\text{próbka kontrolna}) \quad (27)$$

Wówczas, wyliczana jest znormalizowana wartość parametru R określającego czy względny poziom ekspresji (lub liczba kopii) badanego genu porównany między próbką badaną i kontrolną są takie same.

$$R = 2^{-\Delta \Delta C_q} \quad (28)$$

$R = 1$ oznacza, że poziom ekspresji jest taki sam, $R < 1$ - poziom ekspresji w próbce kontrolnej jest wyższy niż w próbce badanej, $R > 1$ - poziom ekspresji w próbce badanej jest wyższy niż w próbce kontrolnej.

Analiza bezwzględna – metoda krzywych standardowych

Kwantyfikacja bezwzględna również wykorzystuje wartości C_q do określenia poziomu ekspresji genów, ale opiera się na znanych wartościach próbki referencyjnej (stężenie lub liczba kopii). Wykorzystuje się krzywe standardowe opisane równaniem regresji liniowej otrzymane z kilku reakcji o seryjnych rozcieńczeniach matrycy, np. rozcieńczenia dziesiętne. Ilość badanego genu jest normalizowana względem kontroli wewnętrznej – genu referencyjnego ekspresjonowanego na niezmiennym poziomie. Do badanej próbki dodawana jest matryca o znanym stężeniu i wartości C_q , która powinna być amplifikowana w takiej samej wydajności i przy użyciu tych samych starterów co matryca badana. Produkt kontroli wewnętrznej powinien różnić się od produktu matrycy badanej wielkością lub posiadaniem wyznakowanych sond, dzięki którym możliwe jest odróżnienie fluorescencji pochodzącej z produktu szukanego, a produktu z kontroli wewnętrznej. Wyznaczenie linii regresji pozwala na określenie współczynnika determinacji R^2 , który opisuje stopień dopasowania otrzymanej prostej w stosunku do modelu.

$$R^2 = \frac{RSS}{TSS} = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (29)$$

gdzie RSS (ang. *Regression Sum of Square*) to suma kwadratów regresji, TSS (ang. *Total Sum of Squares*) – całkowita suma kwadratów, $\hat{y}_i$ – wartość teoretyczna y dla obserwacji i , y_i – wartość y dla obserwacji i , $\bar{y}$ – średnia arytmetyczna wartości y .

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (43–48).

2.9 Badanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii

Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii, MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) jest najniższym stężeniem związku przeciwdrobnoustrojowego, które w kontrolowanych warunkach całkowicie hamuje wzrost badanego szczepu bakterii. Według ustaleń Instytutu Norm Kliniknych i Laboratoryjnych, CLSI (ang. *Clinical & Laboratory Standards Institute*) (49) oraz Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Wrażliwości Mikroorganizmów, EUCAST (ang. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (50) wartości MIC dla badanych związków wyrażane są w [$\mu\text{g/ml}$]. Ze względu na badanie w niniejszej pracy peptydowych kwasów nukleinowych, których wyniki podaje się w [μM = $\mu\text{mol/l}$], wartości wszystkich użytych związków (rybozomy, peptydy, antybiotyki) wyrażono w [μM]. Do wyznaczenia wartości MIC badanych związków stosuje się pożywkę dedykowaną do badań wrażliwości cząsteczek przeciwbakteryjnych – podłoże Muellera-Hintona (MH) w postaci agaru (MHA) lub bulionu (MHB). Wyznaczanie MIC może zostać przeprowadzone m.in. metodą mikrorozcieńczeń lub metodą gradientową z wykorzystaniem pasków nasączonych określonym gradientem stężenia antybiotyku (nie wykorzystano w pracy).

Wyznaczanie MIC metodą mikrorozcieńczeń

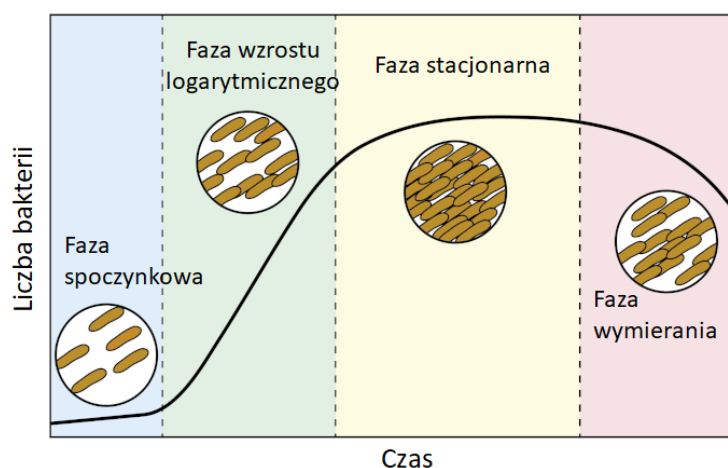
Do sprawdzenia wartości MIC potrzebne są roztwory badanych związków oraz hodowla bakterii przygotowane w ściśle określony sposób.

❖ Przygotowanie rozcieńczeń badanych związków

W celu określenia wartości MIC metodami rozcieńczania należy przygotować roztwory badanych związków. W dołkach (np. kolumny 1) mikropłytki umieszcza się odpowiednią ilość sterylnej pożywki MHB. Zazwyczaj jest to: a) 100 μ l (objętość końcowa) - x μ l (x – ilość związku) w dołkach z wyjściowym stężeniem badanego związku; b) 50 μ l dla rozcieńczeń związku i kontroli wzrostu; c) 100 μ l dla kontroli sterylności (sama pożywka). Wówczas, poczynawszy od dołków ze stężeniem wyjściowym, przeprowadza się podwójne rozcieńczenia seryjne badanych związków. Polega to na przenoszeniu po 50 μ l rozpuszczonego w MHB związku do kolejnych dołków. Na tym etapie otrzymuje się po 50 μ l pożywki z gradientem stężeń badanych związków.

❖ Przygotowanie hodowli bakterii

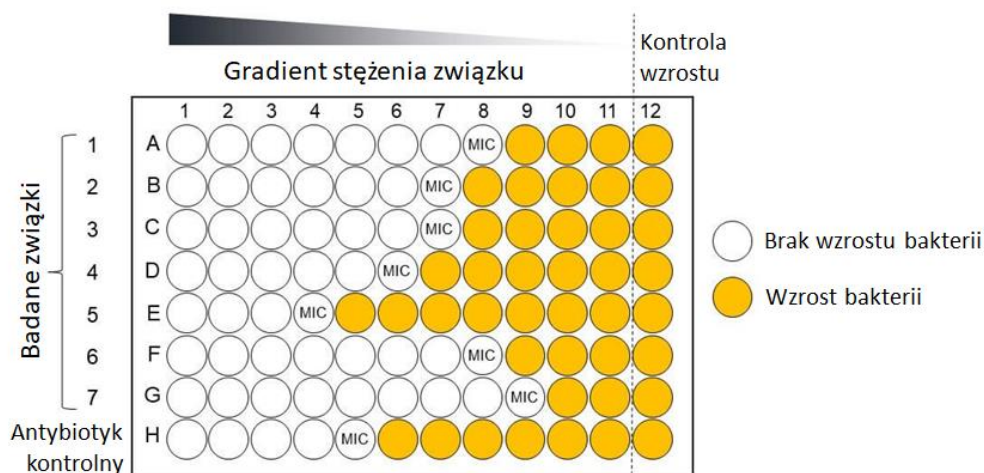
Z wyrosłych na szalce bakterii należy pobrać jedną kolonię z kolonii podobnych morfologicznie i hodować przez noc w podłożu płynnym. Następnego dnia, hodowla bakterii jest odświeżana w podłożu MHB. Po osiągnięciu fazy logarytmicznego wzrostu (Rysunek 11), zawiesina bakterii jest rozcieńczana w podłożu MHB do liczby $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml (CFU, ang. *Colony-Forming Unit* - jednostka tworząca kolonię). Z tak przygotowanej hodowli dodaje się po 50 μ l bakterii do dołków zawierających rozcieńczenia związków oraz dołków dedykowanych kontroli wzrostu.



Rysunek 11. Fazy wzrostu bakterii Źródło: <https://app.jove.com/>

❖ Interpretacja wyników mikrorozcieńczeń

Po inkubacji bakterii z badanymi związkami przeprowadzonej w określonych warunkach (opisano w częściach projektowych), wartość MIC danego związku jest określany jako pierwsze stężenie, które całkowicie uniemożliwiło widoczny wzrost testowanego szczepu bakterii (Rysunek 12).

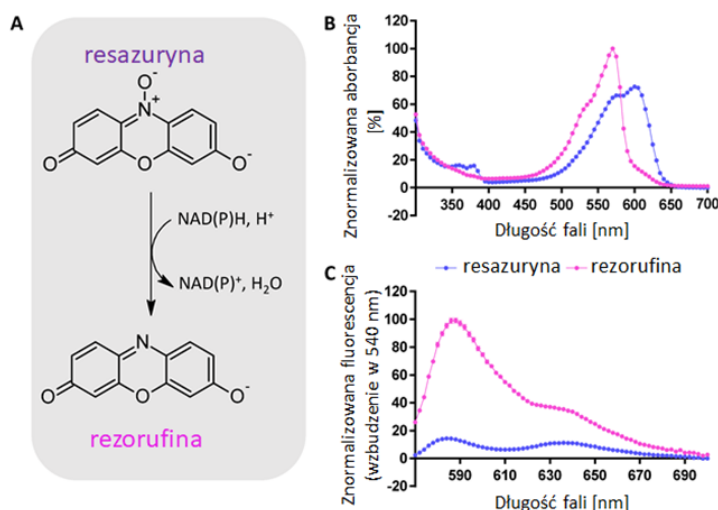


Rysunek 12. Schemat interpretacji wyników mikrorozcieńczeń siedmiu testowanych związków i antybiotyku kontrolnego. Wartość MIC danego związku jest oznaczona jako pierwsze stężenie, w którym nie zaobserwowano wzrostu bakterii. Na schemacie nie umieszczono dołków zawierających samą pożywkę (kontrolę sterylności). Źródło: <https://emerypharma.com>

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (49–51)

2.10 Redukcyjny test resazuryny

Resazuryna jest nietoksycznym barwnikiem, który łatwo przechodzi do wnętrza komórki. Wykazuje bardzo niski poziom fluorescencji, jest wrażliwa na pH środowiska i reakcje redoks. W roztworach o pH poniżej 3,8 przyjmuje kolor pomarańczowy, zaś powyżej 6,5 ciemnoniebieski lub fioletowy. Jest w stanie przenikać do komórek i wykazywać ich żywotność, dzięki podatności na reakcje redoks. W komórkach żywych, a więc aktywnych metabolicznie, w obecności dehydrogenazy NADPH lub NADH resazuryna ulega redukcji do silnie fluorescencyjnej rezorufiny (Rysunek 13). W przypadku martwych komórek nie dochodzi do redukcji, więc kolor barwnika pozostaje niezmieniony. Resazuryna wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 600 nm, zaś rezorufina przy 570 nm, co umożliwia rozdzielną pomiary spektrofotometryczny (52).



Rysunek 13. A. Schemat redukcji resazuryny do rezorufiny. Widma B. absorpcji i C. fluorescencji resazuryny i rezorufiny. Źródło: (52)

3 Metody statystyczne

3.1 Średnia, błąd standardowy średniej i odchylenie standardowe

Średnia $\bar{x}$ jest wartością reprezentującą środek zbioru składającego się z co najmniej dwóch liczb: $x_1, x_2, \dots, x_n$. W przypadku średniej arytmetycznej stanowi wynik sumy wszystkich wartości danego zbioru (gdzie i to wartość pojedynczej próbki) podzieloną przez ich całkowitą liczbę n (53).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (\sum_{i=1}^n x_i) = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (30)$$

Do przedstawienia danych próbki oraz wyjaśnienia przeprowadzonej analizy statystycznej stosuje się m. in. odchylenie standardowe, SD (ang. *Standard Deviation*) oraz błąd standardowy średniej, SEM (ang. *Standard Error of the Mean*). Mogą być stosowane wymiennie obok wyliczonej średniej, mimo że określają różne parametry. SD określa zmienność ilościowo podając rozrzut wartości poszczególnych prób w stosunku do ich średniej (Równanie). SEM ilościowo opisuje niepewność oszacowania średniej, czyli jak bardzo średnia próbki różni się od średniej populacji (Równanie) (54,55).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (31)$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (32)$$

3.2 Dwuczynnikowa analiza wariancji (ANOVA)

Dwuczynnikowa (dwukierunkowa) analiza wariancji, ANOVA (ang. *ANalysis Of VAriance*) ocenia wpływ dwóch zmiennych niezależnych, które kontrolujemy (np. czas, stężenie, związek przeciwbakteryjny, szczep bakterii) o różnych poziomach na jedną zmienną zależną od nich, którą mierzymy (np. hamowanie wzrostu bakterii, emisja fluorescencji białka). Pozwala poznać czy istnieje statystycznie istotna różnica między średnimi zmiennych niezależnych. Dokładniej, czy zmiana poziomu określonej zmiennej niezależnej wpływa na średnią wartość zmiennej zależnej. Wpływ czynników niezależnych na wartość zależną badany jest zarówno oddzielnie, jak i w interakcji ze sobą. Interakcja/Współdziałanie ma miejsce, jeśli jedna zmienna niezależna wykazuje inny efekt pod wpływem poziomu drugiej zmiennej niezależnej. Przykładem może być zahamowanie wzrostu bakterii w czasie pod wpływem większego stężenia badanego związku w porównaniu do mniejszego stężenia lub bakterii inkubowanej w pożywce bez dodatku bez związku.

Aby można było posłużyć się analizą dwukierunkową ANOVA muszą zostać spełnione następujące założenia: jednolitość (homogeniczność) wariancji, losowy i niezależny wybór prób oraz rozkład normalny badanych populacji. Populacją może być np. szczep bakterii, a na podstawie próby wnioskujemy o populacji. Zakładając, że założenia są spełnione, a populacje mają taką samą liczbę obserwacji można rozpatrzyć analizę dwóch zmiennych niezależnych.

Zmienna A posiadającą a poziomów oraz zmienna B posiadającą b poziomów. W analizie dwukierunkowej sprawdza się interakcję AB między zmiennymi (Tabela 2). ANOVA testuje dwie hipotezy: zerową i alternatywną. Pierwsza stanowi o braku istotnych różnic między średnimi populacyjnymi, a wszelkie obserwowane rozbieżności są skutkiem błędu lub dziełem przypadku. Hipoteza przeciwna zakłada, że statystycznie, różnice te nie są przypadkowe. Dla każdej zmiennej, jak

również ich wzajemnych interakcji wyznacza się liczbę stopni swobody (v), sumę kwadratów odchyłeń (SS) i średni kwadrat odchyłeń (MS). Na ich podstawie wylicza się wartość statystyki testowej (F).

Tabela 2. Parametry do przeprowadzenia dwuczynnikowej analizy wariancji. Parametry: $\bar{x}$ – średnia całkowita, a – liczba poziomów zmiennej A, b – liczba poziomów zmiennej B, i – indeks poziomów zmiennej A, j – indeks poziomów zmiennej B, n – liczba wartości danego poziomu, x_{ijk} – wartość k na poziomach i zmiennej A i j zmiennej B.

Zmienna	Liczba stopni swobody (v)	Suma kwadratów odchyłeń (SS)	Średni kwadrat odchyłeń (MS)	Statystyka testowa (F)	Wartość krytyczna (F_v)
A	$v_A = a - 1$	$SS_A = bn \sum_{i=1}^a (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$MS_A = \frac{SS_A}{a - 1}$	$F_A = \frac{MS_A}{MS_e}$	F_{v_A, v_e}
B	$v_B = b - 1$	$SS_B = an \sum_{j=1}^b (\bar{x}_j - \bar{x})^2$	$MS_B = \frac{SS_B}{b - 1}$	$F_B = \frac{MS_B}{MS_e}$	F_{v_B, v_e}
AB	$v_{AB} = (a - 1)(b - 1)$	$SS_{AB} = n \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i - \bar{x}_j + \bar{x})^2$	$MS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{(a - 1)(b - 1)}$	$F_{AB} = \frac{MS_{AB}}{MS_e}$	F_{v_{AB}, v_e}
Błąd (e)	$v_e = ab(n - 1)$	$SS_e = SS_c - SS_A - SS_B$	$MS_e = \frac{SS_e}{ab(n - 1)}$		
Całość	$v_c = abn - 1$	$SS_c = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n (x_{ijk} - \bar{x})^2$			

Podaje się również wartość poziomu istotności statystycznej α o wybranym poziomie ufności (najczęściej 5%), która opisuje rodzaj i prawdopodobieństwo wystąpienia błędu. Przy jej pomocy oraz wartości krytycznej odczytanej z tablic (F_v) określa się prawdziwość hipotezy zerowej. Stosunek wartości F i F_v umożliwia określenie wartości prawdopodobieństwa P uzyskania wartości F przez przypadek. Wskazuje jakie powinny być wyniki, aby odrzucić hipotezę zerową na rzecz alternatywnej.

1. Jeśli $P > \alpha$ hipoteza zerowa zostaje przyjęta, a wynik jest nieistotny statystycznie.
2. W przypadku $P \leq \alpha$ to hipoteza zerowa jest odrzucana, a wynik jest istotny statystycznie. Istotność statystyczną można w uproszczeniu oznaczać systemem gwiazdek.

Dla wielkości α równej 5%, wartości:

$P < 0,0001$ (****) oraz $P < 0,001$ (***) są wysoce istotne statystycznie;
 $P < 0,01$ (**) i $P < 0,05$ (*) istotne statystycznie.

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (56–62)

3.3 Regresja liniowa

Regresja liniowa (ang. *slope intercept*) opisuje zależność zmiennej zależnej y od zmiennej niezależnej x . Zależy również od współczynnika kierunkowego regresji a (ang. *slope*) opisującego nachylenie linii oraz wyrazu wolnego b (ang. *intercept*) wskazującego na jakiej wartości liczbowej dochodzi do przecięcia osi y :

$$y = ax + b \quad (33)$$

W przypadku dwóch punktów A i B, wartość a jest wyznaczana następująco:

$$a = \left(\frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} \right) \quad (34)$$

zaś b :

$$b = y - ax \quad (35)$$

Punktów pomiarowych często jest więcej, a ze względu na ich rozrzut nie przechodzi przez nie jedna prosta. Wtedy do jej optymalnego wyznaczenia, a więc znalezienia najlepszej zależności między wartościami x i y najczęściej stosuje się metodę najmniejszych kwadratów. Polega ona na wytyczeniu takiej linii, której parametry a i b znajdą minimum dla sumy kwadratów różnic wartości obserwowanych (punkty pomiarowe) i wartości wyznaczonych przez model (wartości z równania). Oznacza to jak najmniejsze błędy pochodzące z odległości punktów od wyznaczonej linii. Wówczas wartość a jest wyliczana ze wzoru:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (36)$$

zaś b :

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (37)$$

Do przygotowania tej części skorzystano z następujących materiałów: (63,64)

4 Przeciwbakteryjna aktywność rybozemu *hammerhead*

4.1 Wstęp

4.1.1 *Escherichia coli* jednym z największych zagrożeń bakteryjnych

Analiza danych szpitalnych i naukowych pochodzących z ośrodków na całym świecie i dotyczących oporności bakterii na antybiotyki wykazała, że *Escherichia coli* jest najbardziej niebezpiecznym gatunkiem wśród wszystkich bakterii opornych (8). Tym bardziej jest to niepokojące, ponieważ *E. coli* jest naturalną częścią mikrobioty człowieka i wchodzi w skład bakterii jelitowych już od jego przyjścia na świat (65). Bakteria ta kontroluje równowagę środowiskową chroniąc żywiciela przed patogenami (66). Odpowiada również za biosyntezę witamin K (67) i B (68). W stabilnych warunkach środowiskowych jelit bakterie te nie są szkodliwe. Jeśli jednak naruszone zostaną bariery układu pokarmowego gospodarza lub pojawią się problemy z obniżoną odpornością organizmu, *E. coli* może stać się zagrożeniem dla zdrowia, a nawet życia człowieka (69). Na przestrzeni lat *E. coli* przekształciła się w liczne patogenne szczepy niebezpieczne dla zdrowia ssaków i często doprowadzające do ich śmierci. Do tej pory dobrze scharakteryzowano sześć związanych z przewodem pokarmowym patotypów zjadliwości *E. coli*: dyfuzyjnie przylegające – DAEC, enteroagregacyjne – EAEC, enteroinwazyjne – EIEC, jelitowo-krwotoczne – EHEC, enteropatogenne – EPEC i enterotoksyczne – ETEC. Patotypy te różnią się czynnikami zjadliwości i interakcjami z komórkami eukariotycznymi (69,70). Występują również zakażenia wywołane przez patogeny pozajelitowe, takie jak *E. coli* związana z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych (MNEC) wywołująca także posocznicę oraz uropatogenna *E. coli* (UPEC) będąca główną przyczyną zakażeń dróg moczowych. Ponadto, szczepy EPEC, EHEC i ETEC mogą infekować zwierzęta. Wykryto również patogenną dla ptaków *E. coli* (APEC) odpowiedzialną za choroby drobiu: posocznicę, infekcje dróg oddechowych i zapalenie osierdzia (69).

4.1.2 Kwasy rybonukleinowe

Kwasy rybonukleinowe, RNA (ang. *ribonucleic acids*) są związkami organicznymi zbudowanymi z rybozy połączonej wiązaniem 5'-fosfodiestrowym z resztą kwasu fosforowego tworząc szkielet cukrowo-fosforanowy oraz wiązaniem N-glikozydowym z zasadą azotową. Jedno połączenie powyższych trzech części nosi nazwę rybonukleotydu. Łączą się one w łańcuch poliribonukleotydowy przez grupę fosforanową z jednej strony przyłączoną do węgla 5' rybozy poprzedniego nukleotydu, a z drugiej do węgla 3' następnego nukleotydu. Łańcuch RNA rozpoczyna się grupą fosforanową na 5' - końcu nici, a kończy grupą hydroksylową na końcu 3' (Rysunek 14). Taka budowa nadaje cząsteczce charakter polarny. RNA jest zazwyczaj jednoniciowe, chociaż może wystąpić w postaci dwuniciowej, np. materiał genetyczny wirusów i wiroidów (71,72). RNA dzielimy na kodujące (~3%) (73) i niekodujące (~97%) (74). Do kodujących zalicza się RNA informacyjne – mRNA (ang. *messenger RNA*) przenoszące informację genetyczną zawartą w DNA odnośnie sekwencji aminokwasów do biosyntezy białek zachodzącej w rybosomach. RNA niekodujące (funkcjonalne) stanowi m.in.: transportujące RNA – tRNA (ang. *transfer RNA*) dostarczające aminokwasy do rybosomu oraz rybosomowe RNA – rRNA (ang. *ribosomal RNA*) wchodzące w skład rybosomu (75).

4.1.4 Reakcje katalityczne przeprowadzane przez rybozomy

Enzymy RNA znaleziono w genomach organizmów eukariotycznych i prokariotycznych (80,81). Wyodrębniono trzy grupy naturalnie występujących rybozymów. Są to rybozomy: małowcząsteczkowe, wielkowcząsteczkowe oraz rybosom. Rybozomy małowcząsteczkowe katalizują reakcje z transferem grupy fosforanowej przez samorozszczepienie (ang. *self-cleaving*) lub samoskładanie (ang. *self-splicing*). W obydwu przypadkach ma miejsce atak nukleofilowy na grupę fosforanową, a następnie opuszczenie jej przez jeden atom tlenu. W wyniku reakcji samorozszczepienia powstają dwa produkty, w których wcześniejszy nukleotyd zakończony jest cykliczną grupą 2',3'-fosforanową, a kolejny nukleotyd rozpoczyna się grupą 5'-hydroksylową. Po reakcji samoskładania pierwszy produkt zakończony jest grupą 3'-hydroksylową, zaś drugi rozpoczyna się grupą 5'-fosforanową (81). W cząsteczce 23S rRNA podjednostki 50S rybosomu za reakcję katalizy odpowiada transferaza peptydylowa tworząca wiązanie peptydowe między aminokwasami podczas translacji. Następuje atak nukleofilowy grupy α -aminowej aminokwasu w miejscu A rybosomu na węgiel grupy karboksylowej aminokwasu powstającego w miejscu P rybosomu. W efekcie powstaje peptyd o długości N+1 (w miejscu P) i tRNA z grupą hydroksylową na końcu 5 (w miejscu A) (82). Bazując na naturalnych katalitycznych RNA zaproponowano sztuczne rybozomy o szerszym zakresie aktywności. Cząsteczki te katalizują m. in. reakcje: hydrolizy 2',3'-cyklicznego fosforanu, cięcia, ligacji, fosforylacji, polimeryzacji i kapowania RNA, adenylacji aminokwasów, reakcji aldolowej, utleniania alkoholu, redukcji aldehydów, transferu acylu, tworzenia wiązania peptydowego, syntezy peptydylo-RNA, nukleotydów pirymidynowych i purynowych, amidów, mocznika oraz innych reakcji (79). Co więcej, aktywność katalityczna rybozymów nie wymaga dodatkowych kofaktorów (83). W Tabeli 3 zestawiono wybrane naturalnie występujące rybozomy (81,84–88). Pierwsze z nich odkryto w latach 80. XX wieku. Wszystkie poznane do tej pory enzymy RNA zostały zebrane w bazie danych *Ribocentre*. Znajdują się w niej dane dotyczące m. in. odkrycia, sekwencji, struktur, mechanizmów katalitycznych i zastosowań 21 rodzin rybozymów (89).

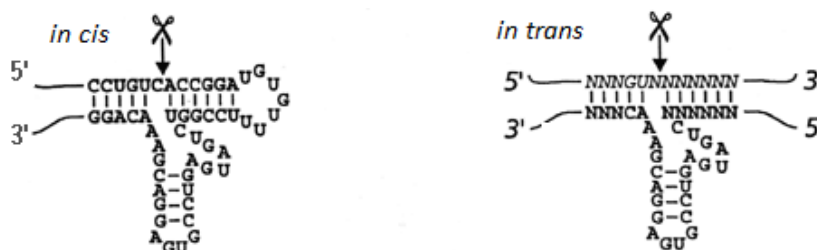
Tabela 3. Charakterystyka naturalnych rybozymów.

Grupa rybozymów	Rybozym	Wielkość [nt]	Reakcja	Kataliza	Główna funkcja	Występowanie
Małowcząsteczkowe	<i>Hammerhead</i>	40-70	transestryfikacja <i>in cis</i>	samorozszczepienie	przetwarzanie multi-merycznych transkryptów podczas replikacji toczącego się koła	wiroidy, wirusy roślinne, prokaryoty, eukaryoty
	<i>Hairpin</i>	~70				wirusy roślinne
	<i>Hepatitis Delta Virus</i>	~90				wirus ludzki
	<i>Varkud Satellite</i>	~160				grzyby <i>Neurospora</i>
	<i>glmS</i>	~170	cięcie nukleolityczne		kontrola genu	bakterie Gram-dodatnie

Wielko- cząsteczkowe	Introny grupy I	210	transestryfikacja <i>in cis</i>	samo- składanie	składanie genu	grzyby, rośliny, protisty, bakterie, bakteriofagi, zwierzęta
	Introny grupy II	500			(ang. <i>splicing</i>)	grzyby, rośliny, protisty, bakterie, archeony
	RNaza P	350-410	hydroliza pre-tRNA		procesowanie tRNA	archeony, bakterie, eukarionty
	snRNA U2/U6	180, 100	transestryfikacja <i>in trans</i>		składanie genu	eukarionty
Rybosom	23S RNA	2600	transfer peptydylu	kataliza transferu peptydylu	powstawanie wiązania peptydowego	archeony, bakterie, eukarionty

4.1.5 Aktywność katalityczna rybozymów *in cis* i *in trans*

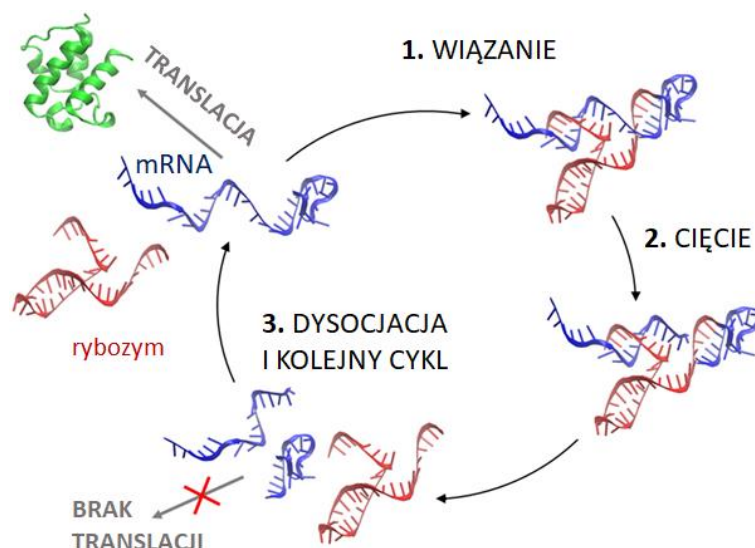
Większość rybozymów katalizuje rozszczepienie RNA na drodze *in cis*, co oznacza, że przeprowadzają one reakcję na substracie obecnym w obrębie tej samej molekuly (Rysunek 16). Z drugiej strony, wykazują one także aktywność *in trans*, w której katalizują substrat będący odrębną cząsteczką RNA (88,90).



Rysunek 16. Cięcie RNA przez rybozym *in cis* i rybozym *in trans*. Źródło: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/>

Właśnie to działanie katalityczne wykorzystano do projektowania nowych, specyficznych rybozymów *in trans* i badania ich potencjału przeciwko różnym patogenom, chorobom oraz użyciu w terapiach genowych. Schemat działania takiego rybozymu składa się z trzech etapów (Rysunek 17):

1. Rybozym rozpoznaje sekwencję docelowego substratu RNA i przez parowanie Watsona-Cricka tworzy z nim kompleks.
2. Następnie, przeprowadza reakcję katalityczną i rozszczepia cząsteczkę substratu w odpowiednim miejscu.
3. Po tym, odłącza się od przeciętej cząsteczki RNA i jest gotowy do rozpoczęcia kolejnego cyklu.



Rysunek 17. Schemat działania terapeutycznego rybozimu o aktywności *in trans* na przykładzie cięcia mRNA bakteryjnego.

4.1.6 Terapeutyczny potencjał rybozymów

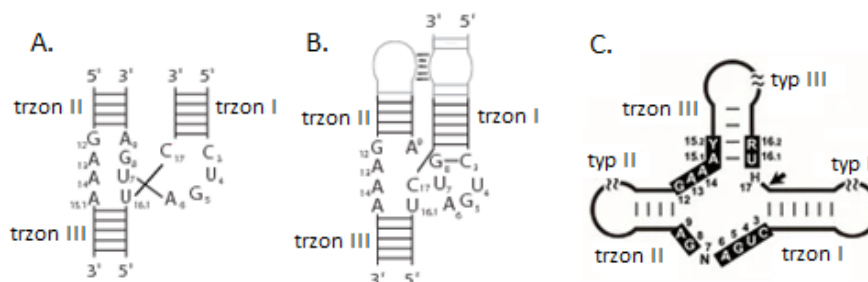
Zdolność cięcia substratów RNA przez rybozimy *in trans* została przetestowana w badaniach klinicznych wykazując ich potencjał w terapiach genowych. Pierwszym syntetycznym rybozymem poddanym takim testom był Angiozym (ANGIOZYME®) (91,92). Jest on skierowany przeciwko mRNA receptora 1 czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGFR-1 (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1*) w celu przerywania jego szlaku, a tym samym zahamowaniu angiogenezy niezbędnej do wzrostu nowotworu i przerzutów. Angiozym wykazał znaczące działanie przeciwnowotworowe, hamowanie przerzutów oraz brak toksyczności w modelach zwierzęcych (91,92). Wstępne badania kliniczne na zdrowych ochotnikach oraz osobach z nieaktywnym nowotworem wykazały dobrą tolerancję i biodostępność, brak znaczących działań niepożądanych rybozimu, jego toksyczności ogólnoustrojowej i laboratoryjnej (92). W II fazie badań klinicznych sprawdzono skuteczność rybozimu u pacjentów w zaawansowanych stadiach choroby (m. in. nowotworach okrężnicy, płuc, piersi), którzy przeszli wcześniej intensywne leczenie. Na tym etapie wykazano brak działania przeciwnowotworowego, co wykluczyło dalsze badania nad Angiozymem (93). Kolejnym rybozymem przeciwnowotworowym jest Herzym (HERZYM®) (94). Jest on skierowany przeciwko mRNA receptora 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu HER-2 (ang. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*). Ten protoonkogen ulega nadekspresji, m. in. w nowotworach piersi i jajnika, odpowiada za ich wzrost oraz przerzuty (95). Działanie rybozimu anty-HER-2 u myszy spowodowało regresję guza (96). Mimo dobrej tolerancji u pacjentów w badaniach klinicznych Herzym wykazał jedynie stabilizację opornego na leczenie guza sutka, nie zaobserwowano choćby częściowego spadku ekspresji mRNA HER-2 (97,98). W badaniach klinicznych znalazły się również rybozimy przeciwwirusowe. Heptazym (HEPTAZYME®), rybozym przeciw HCV (wirus zapalenia wątroby typu C) celujący w sekwencję zawierającą sygnał inicjacji translacji wykazał 10% redukcję wirusa w surowicy pacjentów. Zaobserwowano jednak toksyczność Heptazymu na zwierzętach (ślepotą) i zaprzestano dalszych badań (99,100). Rybozym OZ1 przeciw wirusowi HIV został zaprojektowany do sekwencji mRNA w miejscu nakładania się dwóch niezbędnych mu genów. Mimo efektywnego dostarczenia i ekspresji rybozimu w komórkach, jak również jego dobrej tolerancji nie osiągnięto skuteczności w hamowaniu replikacji wirusa (101,102).

Aktywność katalityczna rybozymów jest testowana w badaniach *in vitro* i *in vivo* również w innych dziedzinach medycyny. Zaobserwowano ich potencjał w hamowaniu nadekspresji białek. Pozytywne wyniki dotyczą chorób mięśniowych oraz neurodegeneracyjnych. W dystrofii mięśni oczno-gardłowych mutacja ludzkiego białka jądowego 1 wiążącego poli(A) PABPN1 (ang. *Poly(A) Binding Protein Nuclear 1*) powoduje trudności w przełykaniu i opadanie powiek. Przeprowadzono testy w modelach komórkowych oraz transgenicznym nicieniach *Caenorhabditis elegans*, w których obecność zmutowanego białka utrudniała im poruszanie się. Użycie rybozymów spowodowało obniżenie poziomu PABPN1, co przełożyło się na poprawę ruchliwości nicieni (103,104). Dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1) jest spowodowana nieprawidłowościami genu kinazy białkowej dystrofii miotonicznej DMPK (ang. *Dystrophia Myotonica-Protein Kinase*). Transkrypty zmienionego genu tworzą ogniska powiązane z patologią mięśnia DM1. W badaniach wykazano wewnątrzkomórkowe rozszczepianie mRNA DMPK i zaobserwowano znaczące zmniejszenie liczby ognisk w ludzkich mioblastach DM1 (105). W chorobie Alzheimera peptyd β -amyloidowy jest głównym składnikiem toksycznych płytek amyloidowych w mózgu. Jego poziom zależy bezpośrednio od aktywności β -sekreazy. Działanie rybozymów zaprojektowanych przeciw temu enzymowi zahamowało jego ekspresję na poziomie mRNA oraz białka w ludzkich komórkach embrionalnych (106). W chorobie Parkinsona dochodzi do degeneracji neuronów, co związane jest z obecnością agregatów α -synukleiny. Zaprojektowany rybozym zmniejszył ekspresję białka α -synukleiny w ludzkich komórkach embrionalnych. Wstrzyknięty do istoty czarnej szczurów, ze sztucznie wywołaną chorobą, znacząco ochronił komórki przed śmiercią apoptotyczną i umożliwił przeżycie większej liczby neuronów (107). W przypadku glejaków użyto modelu ksenoprzeszczepu podskórnego nowotworu u myszy. Wykazano, że równoczesne zastosowanie dwóch rybozymów celujących w dwa istotne do rozrostu glejaka białka całkowicie hamowało wzrost guza (108). Aktywność rybozymów została zaobserwowana również przeciwko wirusom. Rybozym celujący w transkrypt wirusa opryszczki pospolitej HSV (ang. *Herpes Simplex Virus*) zablokował jego reaktywację u większości badanych królików (109). W wirusowych zapaleniach wątroby typu B (110) i C (111), HBV i HCV (ang. *Hepatitis B/C Virus*) rybozymy skutecznie zmniejszały lub eliminowały RNA ulegające ekspresji w komórkach ludzkich (110) i zwierzęcych oraz w pierwotnych hepatocytach ludzkich uzyskanych od pacjentów przewlekle zakażonych HCV (111). Rybozym celujący w mRNA kodujące białko istotne w replikacji wirusa grypy typu A wykazał wysoki poziom hamowania replikacji wirusa w liniach komórkowych zwierząt (112). Sprawdzono aktywność rybozymów w modulacji metabolicznej jako czynnik przeciw glukokinazie w zwierzęcym modelu cukrzycy typu II. Wykazano, że uwalnianie insuliny z trzustki w odpowiedzi na glukozę było zmniejszone (113). Białko p53 kodowane przez gen supresorowy odpowiada za hamowanie wzrostu i różnicowania się komórek nowotworowych oraz bierze udział w naprawie DNA lub indukuje śmierć komórki. Jego mutacja nie tylko wspomaga progres nowotworu, ale prowadzi do jego oporności na chemioterapię. Testy *in vitro* wykazały, że zaprojektowany rybozym z wysoką wydajnością rozszczepiał mRNA zmienionego białka p53 (114). W przeważającej części wymienionych badań został wykorzystany rybozym *hammerhead*.

4.1.7 Rybozym hammerhead

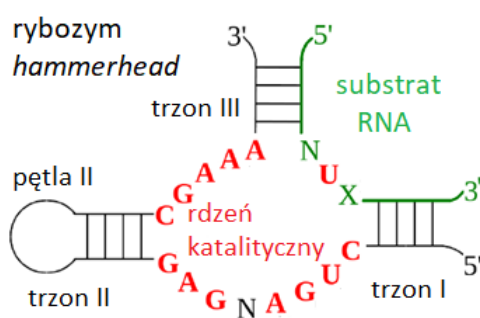
Po raz pierwszy, rybozym *hammerhead* został zidentyfikowany w patogenach roślin - w wirusie pierścieniowej plamistości tytoniu (*Tobacco Ringspot virus*) (115) oraz wiroidzie skazy słonecznej awokado (*Avocado Sunblotch viroid*) (116). Od tamtej pory znaleziono go również w wielu różnych organizmach prokariotycznych i eukariotycznych (87,88). Minimalny rybozym *hammerhead* zawiera 15 nukleotydów w rdzeniu konserwatywnym otoczonych trzema helikalnymi trzonami (I, II, III) (Rysunek 18A). Jednak pełny rybozym *hammerhead*, który wykazuje nawet 2000 razy większą aktywność

katalityczną, posiada dodatkowe stabilizujące strukturę pętle oraz trzeciorzędowe oddziaływania między nimi (Rysunek 18B) (87,88). Większość poznanych naturalnych rybozymów *hammerhead* wykazuje aktywność *in cis* z miejscem cięcia w obrębie nici RNA. Schematycznie, można przedstawić ten rybozym jako zamkniętą kołowo cząsteczkę składającą się z trzech pętli i trzech trzonów typu I, II i III. W związku z tym, występuje on w jednej z trzech form - typu I, II lub III - w zależności, której pętli brakuje, a jej trzon pozostaje „otwarty” (Rysunek 18C).



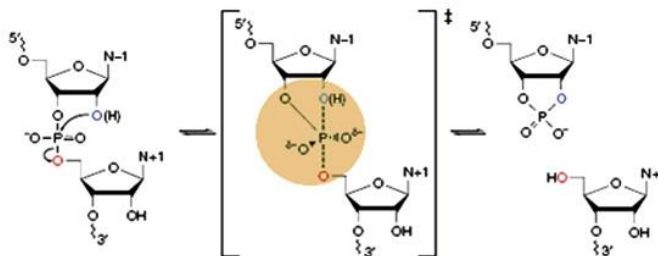
Rysunek 18. A. Struktura minimalnego rybozymu *hammerhead*. B. Struktura pełnego rybozymu *hammerhead*. C. Trzy typy rybozymu *hammerhead*. Źródło: A, B <https://en.wikipedia.org/>; C (87).

Standardowy rybozym *hammerhead* o aktywności *in trans* przyjmuje w kompleksie z substratem RNA formę Y-kształtną i bazuje na konstrukcie typu III. Składa się z konserwatywnego rdzenia katalitycznego w obrębie trzonu II, pętli II i dwóch ramion, które tworzą dwie helisy I i III w kompleksie z substratem RNA (Rysunek 19) (87,88). Miejsce cięcia znajduje się na nici substratu bezpośrednio po specyficznej sekwencji docelowej 5'-NXX↓-3'. N stanowi dowolny nukleotyd, U uracyl, zaś X dowolny nukleotyd z wyjątkiem guaniny, która wiązałaby cytozynę obecną w sekwencji rdzenia katalitycznego uniemożliwiając w ten sposób rozszczepienie substratu (117,118).



Rysunek 19. Schemat struktury drugorzędowej rybozymu *hammerhead* z substratem RNA.

Rybozym *hammerhead* katalizuje reakcję transestryfikacji według mechanizmu dwucząsteczkowej substytucji nukleofilowej S_N2 . Dochodzi do ataku nukleofilowego tlenu grupy 2'-hydroksylowej na fosfor grupy 3'-fosforanowej tworzącej wiązanie 3',5'-fosfodiesterowe między dwoma nukleotydami. Następnie 5'-tlen opuszcza grupę fosforanową. Tym samym, jeden z produktów cięcia zakończony jest cyklicznym 2',3'-fosforanem na końcu 3', zaś drugi grupą 5'-hydroksylową na końcu 5' (Rysunek 20) (81,119).



Rysunek 20. Reakcja transestryfikacji według mechanizmu dwucząsteczkowej substytucji nukleofilowej S_N2 przeprowadzanej przez rybozym *hammerhead* wraz ze stanem przejściowym. Źródło: (81).

Rybozym *hammerhead* jest najlepiej poznanym, najmniejszym i najprostszym rybozymem o wysokiej aktywności katalitycznej. Z tego powodu jest najczęściej wybierany do badań naukowych pod kątem zastosowania w potencjalnych terapiach.

4.1.8 Rybozomy jako potencjalne środki przeciwbakteryjne

Mimo dużego zainteresowania użyciem rybozymów w medycynie, literatura na temat ich aktywności przeciwbakteryjnej jest bardzo uboga. Zaobserwowano aktywność katalityczną eksprymowanego z plazmidu rybozymu zastosowanego przeciw mRNA genu *lexA* kodującego represor transkrypcji w *E. coli* BL21(DE3) (120) oraz zmniejszenie ekspresji mRNA genu *lacZ'* kodującego β -galaktozydazę w *E. coli* XL1-Blue transfekowanej wektorem fagowym (121). W obydwu przypadkach nie celowano w mRNA genów kluczowych bakterii, więc nie mogło dojść do zahamowania ich wzrostu. W jednym z badań udało się zahamować rozmnażanie i przeżywalność bakterii w wyniku cięcia mRNA kluczowego genu *ftsZ*, odpowiedzialnego za podział komórek bakteryjnych. Proces ten nie odbył się jednak za pomocą enzymu RNA tylko przy użyciu enzymu DNA (122). Kolejna praca wykazała skuteczność rozszczepienia mRNA protoonkogenu w komórkach bakteryjnych i ssaczy. Jednak w tym przypadku protoonkogen został wprowadzony wraz z rybozymem jako dodatkowy gen na plazmidzie. Nie było to bezpośrednio mRNA bakteryjne, a użyty rybozym był oparty na RNazie P (123). Mimo różnic, przytoczone wyniki są dobrą podstawą do dalszych badań w kierunku cięcia bezpośrednio mRNA genów kluczowych bakterii przez rybozomy.

W badaniach wykonanych w ramach pracy doktorskiej zaprojektowano rybozym *hammerhead* do cięcia mRNA trzech genów kodujących białka niezbędne bakteriom *E. coli* do życia. Geny wyselekcjonowano na podstawie wyników otrzymanych wcześniej w laboratorium (124) oraz informacji pochodzących z projektu *E. coli* Genome Project przeprowadzonym na szczepie dzikim *E. coli* K-12 MG1655 (125). Wyznaczono takie geny, aby produkty ich ekspresji pełniły różnorodne funkcje w bakterii (Tabela 4).

Tabela 4. Wybrane geny kluczowe *E. coli* i funkcje pełnione przez kodowane przez nie białka.

Gen	*Długość genu [nt]	Białko	*Liczba aminokwasów	Funkcje białka
<i>acpP</i> (126–130)	237	Białko przenoszące grupy acylowe, ACP (ang. <i>Acyl Carrier Protein</i>)	78	Nośnik i kofaktor w biosyntezie kwasów tłuszczowych (126,127) i lipopolisacharydów (endotoksyny) (128,129). Aktywuje również nietoksyczną prohemolizynę w dojrzałą toksynę niszczącą komórki ssaków (130).
<i>murA</i> (131)	1260	Transferaza enoilpirogrotonianowa, EPT (ang. <i>EnoylPyruvate Transferase</i>)	419	Bierze udział w pierwszym etapie biosyntezy peptydoglikanu (131).
<i>frr</i> (132)	558	Czynnik recyklingu rybosomów, RRF (ang. <i>Ribosome Recycling Factor</i>)	185	Odpowiada za dysocjację rybosomów od mRNA po terminacji translacji (132).

*Informacje pochodzą z bazy danych *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes for Bacteria Organisms* (KEGG).

4.1.9 Zalety i wady rybozymów w kontekście ich potencjalnego użycia w terapiach przeciwbakteryjnych

Z przytoczonych wcześniej informacji wynika, że do zalet rybozymów w kategorii terapeutycznej należy bazowanie na ich naturalnej strukturze i aktywności katalitycznej. Są one cząsteczkami RNA, które same w sobie nie są toksyczne dla organizmu. Enzymy RNA są uniwersalne, specyficzne i selektywne. Uniwersalność polega na możliwości zaprojektowania ich przeciw każdej chorobie, nieprawidłowości genetycznej, jak również przeciw różnorodnym patogenom, pod warunkiem, że znamy strukturę pierwszorzędową RNA pożądanego substratu. W przypadku bakterii chorobotwórczych, jeden rybozym może zostać użyty przeciwko wielu szczepom posiadającym tę samą sekwencję celu mRNA. Specyficzność i selektywność rybozymów dotyczy dokładnego rozpoznawania konkretnego substratu mRNA - ciągu nukleotydów wokół docelowego miejsca cięcia. W sytuacji, gdy bakteria uodporni się na jeden rybozym, łatwo można zaprojektować kolejny celujący w obszar w obrębie tego samego transkryptu lub w mRNA innego istotnego genu. Daje to możliwość łatwego ich przeprojektowywania w celach terapeutycznych. Rybozymy można by wykorzystać w stosunku do infekcji spowodowanych bakteriami opornymi, które są bardzo trudne do wyleczenia innymi sposobami.

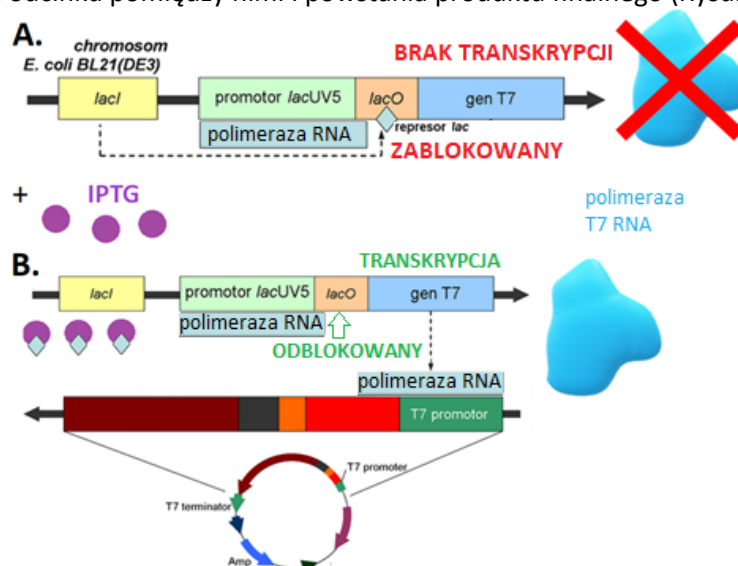
Z kolei wadą enzymów RNA jest ich mniejsza stabilność w porównaniu do stabilności enzymów DNA. Oznacza to, że mogą zostać zdegradowane zanim całkowicie spełnią swoją funkcję terapeutyczną. Większa podatność na hydrolizę oraz ujemny ładunek cząsteczek RNA wymusza taki ich sposób dostarczenia, aby w formie niezdegradowanej przedostały się przez hydrofobową błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki pacjenta. W przypadku rybozymów przeciwbakteryjnych muszą one dostać się jeszcze do komórek bakterii. Ponadto, trzeba bardzo starannie wybrać miejsce cięcia mRNA. Należy dokładnie sprawdzić sekwencję docelowego substratu, aby nie doszło do przecięcia mRNA w komórkach ludzkich. Mogłoby to spowodować opłakane skutki w jego funkcjonowaniu.

4.1.10 Plazmidy bakteryjne

Plazmidy bakteryjne to w większości dwuniciowe, koliste cząsteczki DNA, które mogą replikować bez integracji z chromosomem gospodarza. Różnią się wielkością, mechanizmem repliki, liczbą kopii oraz zakresem gospodarzy. Nie odpowiadają za podstawowe funkcje komórki. Mogą jednak zawierać geny, które okazują się niezbędne, jeśli komórka bakterii znajdzie się w warunkach stresowych i potrzebuje dodatkowej funkcji, aby przetrwać. Jedną z nich jest oporność na antybiotyki. DNA plazmidowe może być przenoszone między komórkami bakterii, a w konsekwencji czynić je opornymi coraz większą ich liczbę. Plazmidy są stosowane na szeroką skalę w biotechnologii i biologii molekularnej jako wektory do klonowania i wektory ekspresyjne do produkcji białek (133,134).

4.1.11 Kontrolowana ekspresja genów operonu *lac* przy użyciu polimerazy T7 RNA

Operon bakteryjny jest funkcjonalną jednostką DNA transkrybowaną jako pojedyncza cząsteczka RNA. Zaczyna się od sekwencji promotora skąd polimeraza RNA rozpoczyna transkrypcję, a z następującą po niej sekwencją operatora tworzą region kontrolny. Sekwencja operatora znajduje się pod kontrolą białka regulatora, które jest zakodowane przed sekwencją operonu. Odpowiada ono za włączanie lub wyłączenie ekspresji genów strukturalnych znajdujących się za regionem kontrolnym. Geny te kodują białka pełniące różne funkcje potrzebne bakterii (135,136). Operony mogą znajdować się na DNA chromosomowym bakterii oraz na DNA plazmidowym. Szczep *E. coli* BL21(DE3) (137) posiada w chromosomie gen polimerazy T7 RNA pod kontrolą promotora *lacUV5*. Służy on głównie do wytwarzania dużych ilości białek z genów sklonowanych pod silnym promotorem w wektorach ekspresyjnych poprzez kontrolowaną indukcję związkami dodawanymi do środowiska bakterii. W przypadku braku induktora, białko represora blokuje transkrypcję operonu poprzez związanie się z sekwencją operatora (Rysunek 21A). W obecności induktora następuje uwolnienie sekwencji operatora na skutek związania induktora z białkiem represora. Najczęściej używanym induktorem jest izopropyl β-D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG). Wówczas polimeraza RNA może przeprowadzić transkrypcję. Ostatecznie produkowana jest polimeraza T7 RNA z chromosomowego DNA bakterii. Jeśli w komórce znajduje się plazmid zawierający sekwencję promotora i terminatora T7 dochodzi do ekspresji genów na odcinku pomiędzy nimi i powstania produktu finalnego (Rysunek 21B) (138).



Rysunek 21. Ekspresja genu z plazmidu pod promotorem T7 przy użyciu polimerazy T7 RNA indukowanej IPTG. **A.** Brak induktora IPTG. **B.** Obecność induktora IPTG. Źródło: (139)

4.2 Materiały i metody

4.2.1 Przewidywanie i wizualizacja struktur kwasów nukleinowych *in silico*

Przewidywania struktur drugorzędowych kompleksów substrat:rybozym przeprowadzono przy użyciu programu Bimolecular Structure Prediction na serwerze RNAstructure (RNAstructure 6.4, Mathews Lab, University of Rochester, NY, USA).

Do przygotowania struktur trzeciorzędowych użyto serwerów RNAfold oraz RNAComposer. Struktury te zwizualizowano w programie Visual Molecular Dynamics program (VMD).

4.2.2 Stężenia oligonukleotydów RNA

Oligonukleotydy RNA substratów oraz rybozymów zamówiono w firmie Future Synthesis (Poland, Poznań). RNA zostało rozpuszczone w sterylnej wodzie miliporowej Milli-Q (MQ – Integral 10).

Przy użyciu spektrofotometru Evolution 300 UV-VIS (Thermo Scientific) w kuwecie o drodze optycznej 1 cm zmierzono absorbancję oligonukleotydów. Współczynniki ekstynkcji RNA zostały podane przez firmę. Stężenia wyliczono na podstawie prawa Lamberta-Beera.

4.2.3 Weryfikacja formowania się kompleksów RNA *in vitro* metodą izotermicznej kalorymetrii miareczkującej (ITC)

Formowanie kompleksów RNA *in vitro* monitorowano jako wydzielaną energię (ciepło i moc) metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego (ITC) przy użyciu kalorymetru Nano ITC Low Volume (TA Instruments) w dedykowanym programie ITCRun. RNA rozpuszczono w buforze reakcyjnym 50 mM Tris-HCl pH 7.5 (Tris(hydroksymetylo)aminometan/Tris – Merck, Kwas solny/HCl – Honeywell) z 10 mM MgCl₂ (Sigma). Substraty i rybozomy inkubowano oddzielnie w temperaturze 37°C przez 10 minut w termomikserze (eppendorf). Stężenie końcowe RNA w kompleksach wynosiło: Substrat:Rybozomy_{krótkie} (S:Rz_{krótki} 32 μM:7 μM), Substrat:Rybozomy_{długie} (S:Rz_{długi} 42 μM:6 μM). Nadmiar substratu o objętości 70 μl został umieszczony w strzykawce, zaś 300 μl rybozymu znajdowało się w celce pomiarowej kalorymetru. Celka referencyjna została napełniona wodą MQ. Czas ekwilibracji systemu przed pierwszym miareczkowaniem zobrazowany jako linia bazowa wynosił 200 sekund. Przeprowadzono 17 miareczkowań substratu do rybozymu, każde o objętości 3 μl, co 500 sekund z prędkością mieszania 350 rpm. Dane zostały zanalizowane dedykowanym oprogramowaniem NanoAnalyse (TA Instruments).

4.2.4 Cięcie substratu RNA przez rybozomy na drodze reakcji transestryfikacji *in vitro*

Reakcje cięcia *in vitro* przeprowadzono w 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂. Substraty i rybozomy inkubowano oddzielnie w 90°C przez 1 minutę w celu rozwinięcia struktury RNA. Następnie, próbki stopniowo schłodzono do 37°C, aby uzyskały odpowiednią strukturę przestrzenną. Substraty zmieszano z odpowiednimi rybozymami i przeprowadzono reakcje cięcia w 37°C. Próbkę pobierano w odpowiednich punktach czasowych i zatrzymywano reakcję dodaniem 50 mM EDTA (kwas wersenowy, ThermoFisher Scientific).

4.2.5 Rozdział cząsteczek RNA po trawieniu metodą elektroforezy żelowej pionowej

Próbki pobrane podczas reakcji cięcia rozpuszczono i ustabilizowano formamidem (FORMAzol, Molecular Research Center) w stosunku 1:1. RNA kontrolne substratów i rybozymów obciążono barwnikiem 6x Loading Dye (ThermoFisher Scientific). Przed nałożeniem na żel RNA zdenaturowano w 55°C przez 3 minuty. Próbkę rozdzielono na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M

mocznikiem, 10% APS oraz TEMED (40% roztwór bis-akrylamidu – Bio-Rad, mocznik – Sigma, nadsiarczany amonu/APS – Sigma, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina/TEMED – Sigma) w buforze 1xTBE (tris – Merck, kwas borowy – Sigma, wersenian sodu/Na₂EDTA – Sigma) przy użyciu aparatu do elektroforezy pionowej ASG-250 Gel System (C.B.S. Scientific).

Po polimeryzacji żelu, studzienki ostrożnie przepłukano buforem do elektroforezy 1xTBE, aż do pozbycia się z nich resztek akrylamidu. W celu podgrzania żelu i usunięcia pozostałości mocznika, przeprowadzono elektroforezę wstępną bez próbek („pre-run”) przez 30 minut przy napięciu 400 V. Ponownie przepłukano studzienki, a następnie nałożono do nich próbki. Elektroforeza właściwa przy napięciu 400 V trwała 3 godziny i 30 lub 45 minut. Po zakończeniu elektroforezy żele wybarwiono barwnikiem do kwasów nukleinowych SYBR Gold (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) rozcieńczonym w buforze 1xTBE. RNA na żelach zwizualizowano przy użyciu systemu do obrazowania żeli Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad) korzystając z dedykowanego oprogramowania Image Lab Software (Bio-Rad). Intensywności prążków RNA do analizy również zmierzono w Image Lab Software.

4.2.6 Projektowanie plazmidu z systemami z rybozymem

Sekwencje systemów z rybozymem na plazmidzie pUC57(Kan) zaprojektowano i sprawdzono w programie SnapGene Viewer. Plazmidy z zaprojektowanymi wstawkami zamówiono w firmie BioCat (Niemcy, Heidelberg). DNA plazmidowe zostało rozpuszczone w sterylnej wodzie miliporowej MQ. Stężenia próbek zostały zmierzone przy użyciu spektrofotometru DeNovix DS-11 Spectrophotometer.

4.2.7 Szczepy bakterii i przygotowanie komórek kompetentnych

Za pomocą zestawu *E. coli* Transformer Kit (A&A Biotechnology) przygotowano komórki kompetentne szczepu *E. coli* TOP10 w celu wtransformowania do nich zakupionych plazmidów i zachowania w laboratoryjnym banku bakterii.

Do badań właściwych użyto szczepu *E. coli* BL21(DE3) (137,138). Posiada on gen polimerazy T7 RNA pod promotorem lacUV5. Polimeraza T7 RNA jest niezbędna do regulowania syntezy rybozymów dostarczonych do komórki bakterii na DNA plazmidowym pod promotorem T7.

Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* BL21(DE3) rozpoczęto od wysiania bakterii na szalkach z pożywką LB (bulion lizogenny – VWR) zestalonych agarem, LA (bulion lizogenny z agarem – VWR) i inkubowano przez noc w 37°C. Następnie, jedną kolonię bakterii zaszczepiono do 10 ml płynnego LB i wytrząsano przy 600 rpm przez noc w 37°C (Thermomixer comfort, Eppendorf). Kolejnego dnia 1 ml hodowli nocnej dodano do 100 ml świeżej, płynnej pożywki LB i wytrząsano w 37°C przy 165 rpm (Incubator Shaker Series, Innova 44) do osiągnięcia przez bakterie gęstości optycznej między 0,2, a 0,3 mierzonej przy długości fali 600 nm. Hodowlę bakterii rozdzielono po 50 ml do dwóch sterylnych probówek wirówkowych (typu Falcon 50 ml) i inkubowano na lodzie przez 20 minut. Zwirowano bakterie w 4°C przy 5000 x g przez 15 minut (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Usunięto supernatant, a osad zawieszono w 10 ml schłodzonego na lodzie 0.1 M chlorku wapnia (CaCl₂ – Sigma). Bakterie inkubowano na lodzie przez 40 minut i ponownie zwirowano w 4°C przy 5000 x g przez 15 minut. Usunięto supernatant, a osad zawieszono w 0.6 ml objętości końcowej schłodzonego na lodzie 0.1 M CaCl₂. Dodano 0.6 ml schłodzonego na lodzie 50% glicerolu (POCH) i zmieszano z bakteriami. Tak uzyskane komórki kompetentne rozporcjonowano po 100 µl i zamrożono w -80°C.

4.2.8 Transformacja komórek kompetentnych

Zakupione plazmidy wtransformowano do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 według protokołu z zestawu *E. coli* Transformer Kit (A&A Biotechnology) i zachowano w banku bakterii.

Plazmidy do eksperymentów *in vivo* oraz komórki kompetentne *E. coli* BL21(DE3) inkubowano na lodzie przez 15 minut w celu uzyskania tej samej temperatury. Następnie, dodano po 50 ng DNA plazmidowego na każde 100 µl komórek kompetentnych i delikatnie zmieszano. Przeprowadzono

również transformację kontrolną z użyciem wody w celu sprawdzenia sterylności pożywki i poprawności przeprowadzonej transformacji. Komórki kompetentne inkubowano na lodzie przez 30 minut, następnie w 42°C przez 2 minuty (szok cieplny) i ponownie na lodzie przez 2 minuty. Do 100 µl poszczególnych komórek kompetentnych dodano po 1 ml podgrzanej do 37°C płynnej pożywki LB i wytrząsano przez 1 godzinę w 37°C przy 300 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf). Następnie, bakterie zwirowano przez 1 minutę przy 5000 rpm. Usunięto 1 ml pożywki LB, a osad zawieszono w pozostałych 100 µl pożywki. Bakterie wysiano na szalkach LA z kanamycyną o końcowym stężeniu 50 mg/ml (Kan – Gibco, Fluorochem) i inkubowano przez noc w 37°C.

4.2.9 Hodowla bakterii i badanie aktywności rybozemu *in vivo*

Jedną kolonię każdego z transformantów *E. coli* BL21(DE3) zaszczerpiono do 1 ml pożywki LB, MHB (bulion Mueller Hinton – Difco) lub Davisa (pożywka minimalna zawierająca składniki odżywcze niezbędne wyłącznie do wzrostu szczepów *E. coli* (140)) z końcowym stężeniem glukozy 0.4% (podłoże minimalne Davis – Sigma, D-(+)-glukoza (Sigma)). Hodowlę nocną w pożywkach LB i MHB przeprowadzano z dodatkiem kanamycyny o końcowym stężeniu 50 µg/µl. W części eksperymentów dodawano jony magnezu Mg²⁺ o końcowych stężeniach: 2,5, 5 lub 10 mM (chlorek magnezu MgCl₂ – Sigma). Podczas stosowania pożywki Davisa hodowle prowadzono bez kanamycyny i bez jonów magnezu. Hodowla była prowadzona przez noc w 37°C z wytrząsaniem 600 rpm. Następnego dnia, eksperymenty przeprowadzano na dwa sposoby: 1.) przy użyciu szklanych probówek (w pożywce LB, MHB lub Davisa) oraz 2.) 96-dółkowych mikropłytek (w pożywce MHB lub Davisa). Pomiar gęstości optycznej prowadzone były przy długości fali 600 nm.

Pomiary w szklanych probówkach

Bakterie z każdej hodowli nocnej rozcieńczono 100-krotnie w 2 ml tej samej świeżej pożywki. W przypadku hodowli w pożywkach LB i MHB, w części eksperymentów dodano jony magnezu Mg²⁺ o końcowych stężeniach odpowiednio takich samych, jak w hodowli nocnej: 2,5, 5 lub 10 mM. Każdy transformant odświeżono w dwóch szklanych probówkach (DURAN), aby podzielić hodowle na dwie grupy – z dodatkiem i bez IPTG. Bakterie wytrząsano przy 600 rpm w 37°C i mierzono gęstość optyczną co 30 lub 60 minut przy użyciu spektrofotometru SP-830 Plus firmy Metertech. Na początku lub po 180 minutach hodowli w pożywce LB, 150 minutach w pożywce MHB oraz 240 minutach w pożywce Davisa do jednej z grup dodano induktor IPTG o końcowym stężeniu 1 mM. Pomiar w każdym punkcie czasowym były poprzedzone pomiarem referencyjnym gęstości optycznej odpowiedniej sterylnej, czystej pożywki (tzw. *blank*).

Pomiary w mikropłytkach

Bakterie z każdej hodowli nocnej rozcieńczono 100-krotnie w odpowiedniej, świeżej pożywce, jednak końcowa objętość próbki w każdej studzience wynosiła 100 µl. W jednym powtórzeniu biologicznym dla każdego transformanta wykonano 6 powtórzeń technicznych z induktorem IPTG i 6 bez IPTG. Końcowe stężenie IPTG wynosiło 1 mM, ale związek dodano do pożywki jeszcze przed dodaniem bakterii. Przeprowadzono 2 biologiczne powtórzenia w pożywce MHB i 3 w pożywce Davisa (2 dla rybozemu długiego). Na każdej płytce były 24 studzienki zawierające po 100 µl czystej pożywki użytej jako optyczna kontrola sterylności, a później do obliczeń jako tło odejmowane od reszty pomiarów. Płytki (Nest Scientific Biotechnology) zaklejało transparentną, sterylną folią (Microplate Sealing Films, EXCEL Scientific). Gęstość optyczna bakterii była mierzona w czytniku mikropłytek Microplate Biotek Synergy H1 co 30 minut w programie Gen5.

4.2.10 Pomiar poziomu mRNA_{acpP} za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)

Nowe eksperymenty kinetyki przeprowadzono dla trzech wybranych hodowli w pożywce Davisa z 1mM IPTG na mikropłytkach (opisano w pkt. 4.2.9.). Wykonano dwa powtórzenia biologiczne na jedną hodowlę, z których każde miało po dziesięć powtórzeń technicznych. Hodowle bakterii z każdego powtórzenia biologicznego zmieszano i zwirowano. Dokładnie usunięto pożywkę, a z pozostałego osadu bakterii natychmiast wyizolowano RNA przy użyciu zestawu Universal RNA Purification Kit (EURx). Wszystkie powierzchnie oraz plastiki używane przy izolacji oczyszczono płynem RNaseZap (Invitrogen) w celu ochrony RNA przed degradacją RNazami. Stężenie i czystość RNA sprawdzono spektrofotometrycznie analizując krzywą absorbancji oraz stosunek absorbancji przy długości fal: 260/280 oraz 260/230. W przypadku zanieczyszczenia RNA reagentami z zestawu do izolacji, próbki oczyszczono używając zestawu RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research). Tak przygotowane RNA wykorzystano do przeprowadzenia jednoetapowej ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR) zgodnie z protokołem z zestawu iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (Bio-Rad) w termocyklerze C1000 Touch CFX96 Real-Time (Bio-Rad) i dedykowanym programie CFX Maestro (Bio-Rad). Każda reakcja zawierała 50 ng bakteryjnego RNA. Do weryfikacji cięcia docelowego mRNA zaprojektowano trzy oligonukleotydy DNA, zaś sekwencje starterów do mRNA genu referencyjnego zostały zaczerpnięte z literatury. Reakcje przeprowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych, w co najmniej dwóch niezależnych powtórzeniach technicznych każdej hodowli. Temperatura topnienia na etapie hybrydyzacji starterów do matrycy DNA (tzw. *annealing*) wynosiła 54,1°C. Względną ekspresję genów w próbkach obliczono metodą porównawczą ΔC_q , a następnie poddano dwuczynnikowemu testowi ANOVA z odniesieniem do wyników otrzymanych dla genu referencyjnego.

4.2.11 Synergia rybozymu z tetracykliną

Powtórzono eksperyment kinetyki wzrostu dla wszystkich transformantów. Bakterie na mikropłytkę hodowano w pożywce MHB z 1 mM IPTG (jak opisano w pkt. 4.2.9) i inkubowano w sześciu stężeniach tetracykliny (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 μ M). Stężenia antybiotyku przygotowano bazując na protokole seryjnych rozcieńczeń zgodnie ze standardami CLSI według metody M07-A10 (49). Eksperyment trwał 20 godzin z pomiarami gęstości optycznej rejestrowanymi co 30 minut przy długości fali 600 nm. Wykonano dwa powtórzenia biologiczne otrzymując od dwóch do pięciu powtórzeń technicznych na hodowlę.

4.2.12 Porównanie docelowej sekwencji cięcia rybozymu w szczepach patogennych

W bazie danych KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) znaleziono docelową sekwencję cięcia substratu mRNA_{acpP} w szczepie *E. coli* BL21(DE3). Następnie, z tej samej bazy wyselekcjonowano 12 patogennych szczepów *E. coli* i porównano ich sekwencje przy użyciu serwera Microbial Nucleotide BLAST i programu blastn. Sekwencje pobrano w plikach FASTA i zestawiono w programie BioEdit Sequence Alignment Editor.

4.2.13 Analiza statystyczna

Przed pomiarem gęstości optycznej w szklanych probówkach, każdorazowo wykonywano pomiar czystej pożywki (tzw. *blank*). W związku z tym, dane surowe zmierzone w szklanych probówkach mogły

być od razu użyte do wykonania wykresów. Analizę wyników przeprowadzono w programie Microsoft Excel. W przypadku pomiarów gęstości optycznej na mikropłytkach wartości kontroli sterylności zostały uśrednione, a następnie odjęte od wartości gęstości optycznej hodowli bakterii. Powtórzenia dla każdego transformantu uśredniono i porównano do kontroli wzrostu za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA, który tak jak wykresy wykonano w programie GraphPad Prism 8.

4.3 Wyniki

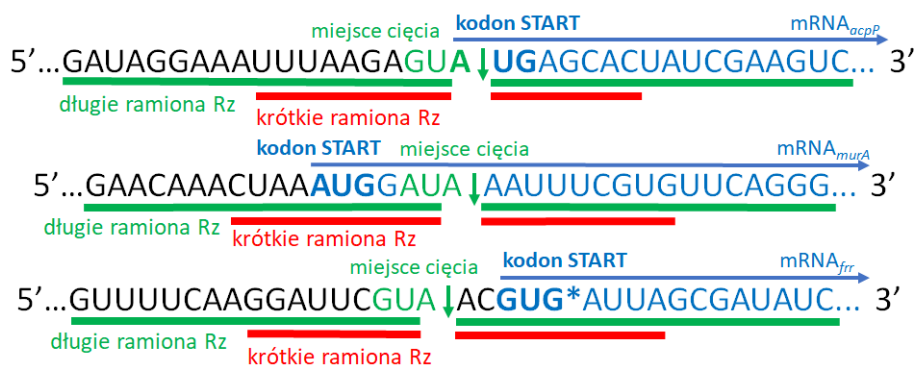
4.3.1 Rybozym *hammerhead* i miejsca cięcia na wybranych substratach mRNA

Testowany rybozym *hammerhead* (Rz) składa się z dwóch części. Pierwsza, o długości 23 nukleotydów ma stałą sekwencję i obejmuje rdzeń katalityczny, trzon II oraz pętlę rybozimu (Rysunek 22). Drugą część stanowią ramiona rybozimu wiążące się komplementarnie do docelowej sekwencji mRNA, z którą tworzą kompleks substrat:rybozym (S:R). Do każdego substratu zaprojektowano dwa warianty rybozimu *hammerhead* - rybozym z ramionami krótkimi (Rz_{krótki}) i rybozym z ramionami długimi (Rz_{długi}).



Rysunek 22. Zaprojektowany rybozym *hammerhead* z krótkimi i długimi ramionami w kompleksie z substratem.

Wybrano trzy geny produkujące białka niezbędne *E. coli* do życia: *acpP* (126–130), *murA* (131) i *frr* (132). Inne badania przeprowadzone w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych (141,142), potwierdzają blokowanie sekwencji GAGUAUGAG leżącej w obrębie miejsca rozpoczęcia translacji (kodonu START) mRNA_{*acpP*}. Na podstawie powyższych wyników wyselekcjonowano dwie trójki nukleotydów do cięcia mRNA przez rybozym w obszarze kodonu START. Sekwencja GUA stanowi jedną z najlepszych sekwencji do efektywnego cięcia przez rybozym *hammerhead* (117). Wybrano ją jako docelowe miejsce rozszczepienia mRNA genów: *acpP* oraz *frr*. W przypadku mRNA genu *murA*, w celu zachowania bliskiej odległości miejsca cięcia od kodonu START i przy równoczesnym braku sekwencji GUA, wybrano trójkę AUA, która również podlega efektywnej reakcji transestryfikacji (143). Obydwie trójki nukleotydów występują w naturalnych substratach rybozymów *hammerhead* (144). Na Rysunku 23 przedstawiono fragmenty mRNA z miejscami cięcia wybranych genów, a w Tabeli 5 sekwencje substratów i rybozymów użytych w badaniach.



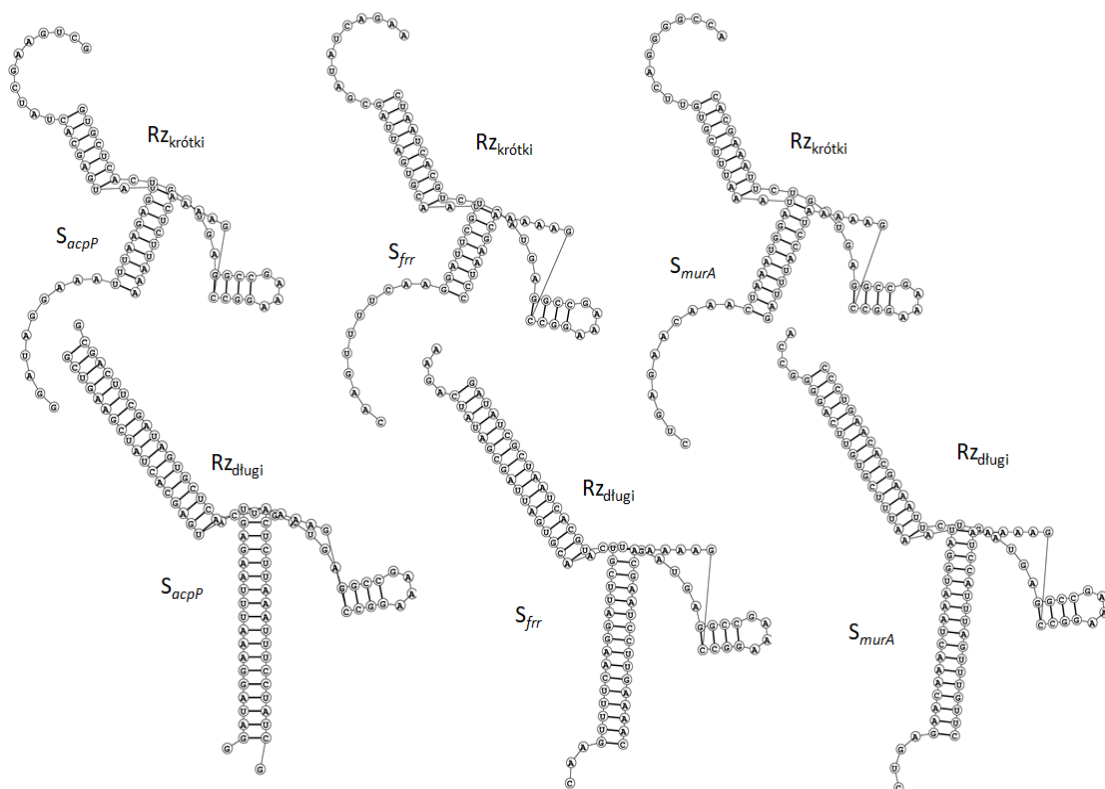
Rysunek 23. Fragmenty mRNA wybranych genów białek niezbędnych bakteriom do życia. GUG* - alternatywny kodon START w niektórych organizmach prokariotycznych.

Tabela 5. Sekwencje RNA wybranych fragmentów substratów mRNA i zaprojektowanych rybozymów. W sekwencjach substratów pogrubiono miejsca cięcia. W sekwencjach rybozymów pogrubiono stałą sekwencję rybozimu *hammerhead*, w tym rdzeń katalityczny zaznaczony kolorem czerwonym.

RNA	Sekwencja 5' → 3'	Długość
gen <i>acpP</i>		
<i>S_{acpP}</i>	GGAUAGGAAAUUUAAGAGUAUGAGCACUAUCGAAGUCG	38 nt
RZ _{krótki}	GUGCUCACUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACUCUUA	39 nt
RZ _{długi}	GCGACUUCGAUAGUGCUCACUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACUCUUAUUUCCUAUCG	61 nt
gen <i>murA</i>		
<i>S_{murA}</i>	CUGAGAACAAACUAAAUGGAUAAUUUCGUGUUCAGGGGCCA	42 nt
RZ _{krótki}	CACGAAAUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAUUCCAUUUAG	43 nt
RZ _{długi}	CCCUGAACACGAAAUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAUUCCAUUUAGUUUGUUC	57 nt
gen <i>frr</i>		
<i>S_{frr}</i>	CAAGUUUUCAGGAUUCGUAACGUGAUUAGCGAUUAUCAGAA	41 nt
RZ _{krótki}	CUAAUCACGUUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACGAAUCC	42 nt
RZ _{długi}	GAUAUCGCUAUACACGUUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAACGAAUCCUUGAAAC	57 nt

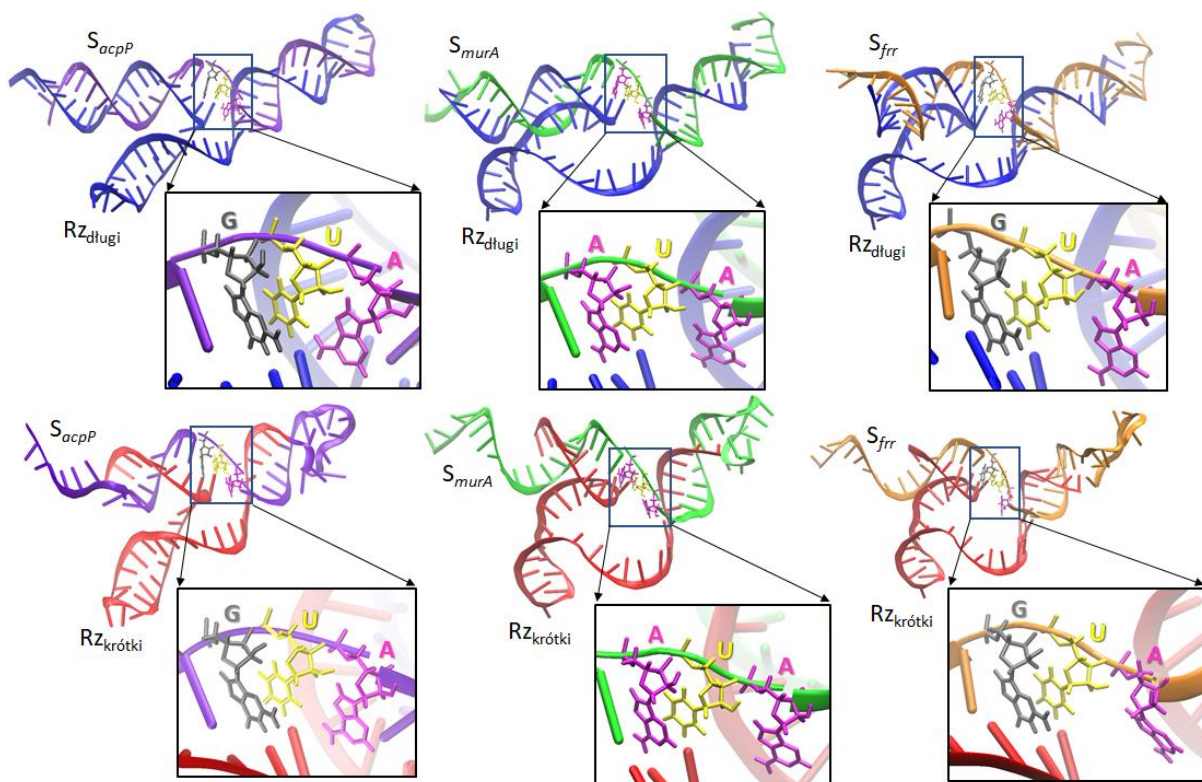
4.3.2 Zaprojektowane warianty rybozimu i ich kompleksy z substratem *in silico*

Sprawdzono powstawanie kompleksów między sekwencjami wybranych fragmentów trzech substratów mRNA z zaprojektowanymi rybozymami. Wyniki wykazały formowanie się oczekiwanych kompleksów substratów z obydwoma wariantami rybozimu celowanymi w każdy z nich (Rysunek 24).



Rysunek 24. Struktury dwuwymiarowe kompleksów rybozymów z substratami.

Na rysunku 25 przedstawiono przewidywane struktury trójwymiarowe wszystkich kompleksów wraz z miejscami cięcia: *S_acpP*:*RZ_krótki*, *S_acpP*:*RZ_długi*, *S_murA*:*RZ_krótki*, *S_murA*:*RZ_długi*, *S_frr*:*RZ_krótki* i *S_frr*:*RZ_długi*.

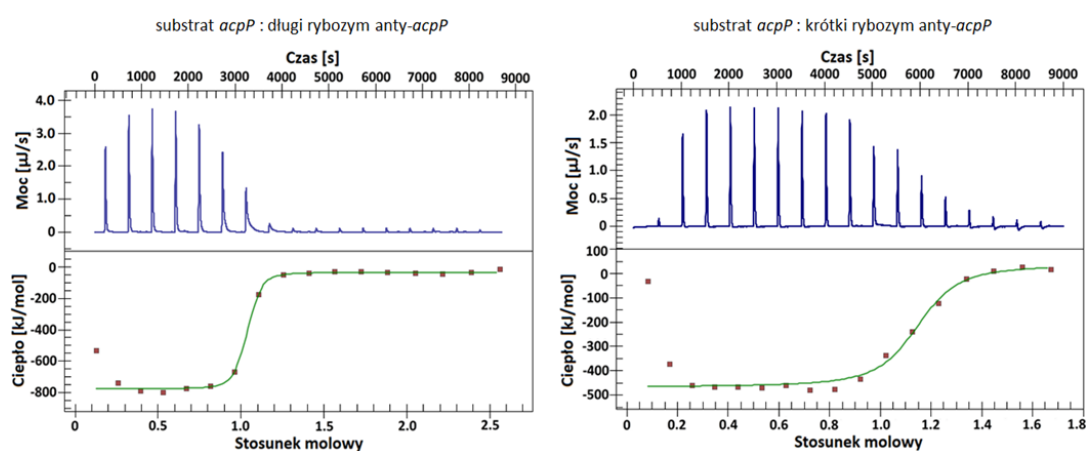


Rysunek 25. Struktury trójwymiarowe kompleksów rybozymów z substratami. Powiększono sekwencję trójek nukleotydów z miejscami cięcia substratów (G – guanina, U – uracyl, A – adenina).

4.3.3 Formowanie się kompleksów substrat:rybozym *in vitro*

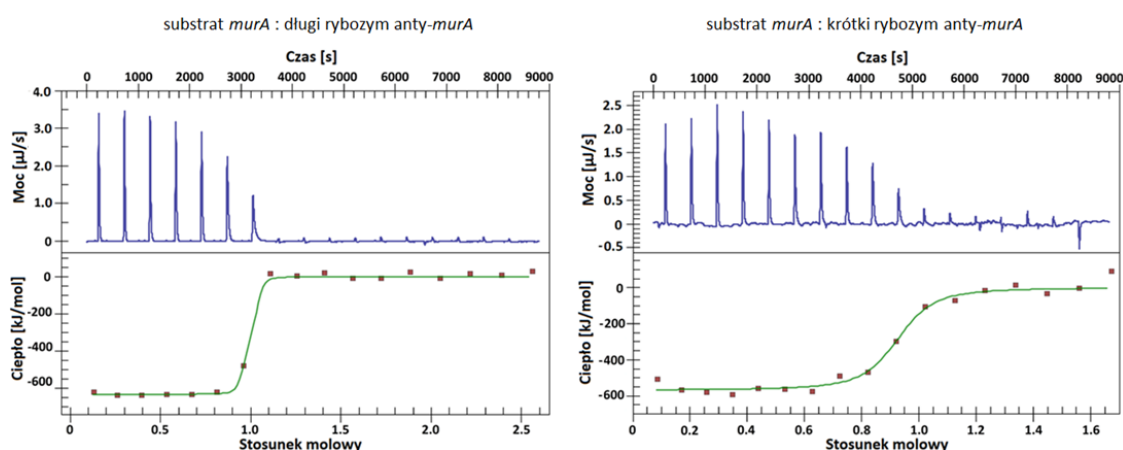
Wyniki miareczkowania fragmentów substratów mRNA do rybozymów we wszystkich przypadkach potwierdziły powstawanie kompleksów S:R o czym świadczą otrzymane krzywe sigmoidalne (Rysunek 26–28). Procesy są spontaniczne i przebiegają z wydzielaniem ciepła, większego w przypadku wiązania substratów z Rz_{długi} niż z Rz_{krótki}. Stechiometria wiązania S:R oscyluje w granicach 1:1, co oznacza, że na jedną cząsteczkę substratu przypada jedna cząsteczka rybozymu. Stałe asocjacji (K_A) o rzędach wielkości 10^7 - 10^9 M⁻¹ oraz dysocjacji (K_D) o rzędach wielkości 10^{-9} - 10^{-8} M potwierdzają tworzenie się stabilnych kompleksów. Wskazują również, że rybozimy długie silniej wiążą substrat niż rybozimy krótkie. Im dłuższy kompleks S:R, tym większa energia układu (Tabela 6).

Fragment substratu mRNA_{acpP} z Rz_{długi} tworzy kompleks związany przez 38 par zasad (pz), natomiast z Rz_{krótki} przez 16 pz. Stosunek molowy wiązania substratu do Rz_{długi} wynosi 0,97, zaś do Rz_{krótki} 1,1 (Rysunek 26, Tabela 6).



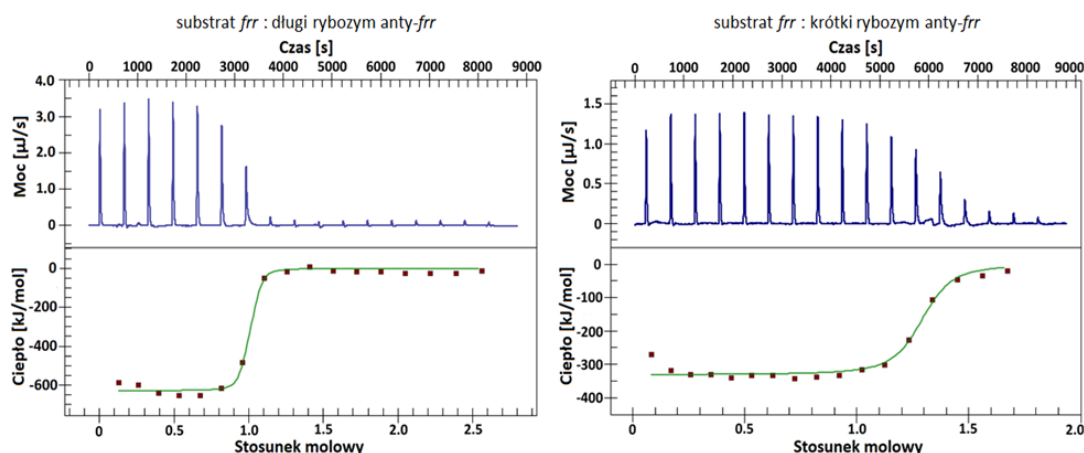
Rysunek 26. Wyniki pomiarów ITC wiązania substratu mRNA_{acpP} do rybozymów.

Fragment substratu mRNA_{murA} z Rz_{długi} tworzy kompleks związany przez 34 pz, natomiast z Rz_{krótki} przez 20 pz. Stosunek molowy wiązania substratu do Rz_{długi} wynosi 0,93, zaś do Rz_{krótki} 0,88 (Rysunek 27, Tabela 6).



Rysunek 27. Wyniki pomiarów ITC wiązania substratu mRNA_{murA} do rybozymów.

Fragment substratu mRNA_{frr} z Rz_{długi} tworzy kompleks związany przez 34 pz, natomiast z Rz_{krótki} przez 19 pz. Stosunek molowy wiązania substratu do Rz_{długi} wynosi 0,94, zaś do Rz_{krótki} 1,23 (Rysunek 28, Tabela 6).



Rysunek 28. Wyniki pomiarów ITC wiązania substratu mRNA_{frr} do rybozymów.

Tabela 6. Wartości termodynamiczne wiązania substratów *acpP*, *frr* i *murA* do rybozymów otrzymane metodą ITC.

Kompleks	Liczba par zasad	K_A [M^{-1}]	K_D [M]	Stosunek molowy	ΔH [kJ/mol]	$T\Delta S$ [kJ/mol]	ΔG [kJ/mol]
<i>S</i> _{acpP} :Rz _{krótki}	16	$2,949 \times 10^7$	$3,391 \times 10^{-8}$	1,10	-501,6	-457,2	-44,4
<i>S</i> _{acpP} :Rz _{długi}	38	$1,973 \times 10^8$	$5,069 \times 10^{-9}$	0,97	-743,6	-694,4	-49,2
<i>S</i> _{murA} :Rz _{krótki}	20	$3,983 \times 10^7$	$2,511 \times 10^{-8}$	0,88	-568,4	-523,2	-45,2
<i>S</i> _{murA} :Rz _{długi}	34	$1,000 \times 10^9$	$1,000 \times 10^{-9}$	0,93	-632,6	-579,1	-53,5
<i>S</i> _{frr} :Rz _{krótki}	19	$6,578 \times 10^7$	$1,520 \times 10^{-8}$	1,23	-318,1	-271,7	-46,4
<i>S</i> _{frr} :Rz _{długi}	34	$3,023 \times 10^8$	$3,308 \times 10^{-9}$	0,94	-628,1	-577,8	-50,3

4.3.4 Cięcie substratów RNA przez zaprojektowane warianty rybozymu *in vitro* i weryfikacja produktów trawienia

Cięcie fragmentu substratów mRNA przez rybozym

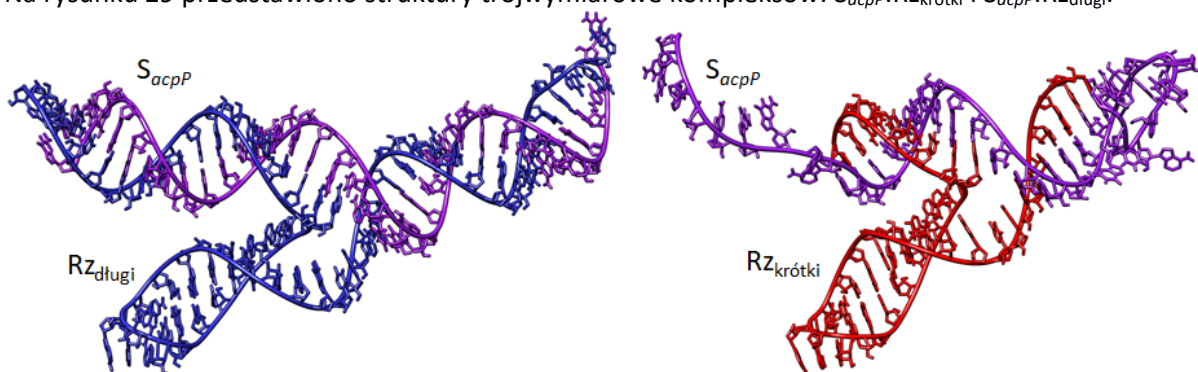
Każdy z trzech fragmentów substratów mRNA (mRNA_{acpP}, mRNA_{murA}, mRNA_{frr}) inkubowano z dedykowanymi im rybozymami w dwóch wariantach długości ramion: Rz_{krótki} i Rz_{długi}. Łącznie, przygotowano sześć par S:R (Tabela 5). Podczas oddzielnych inkubacji sześciu kompleksów RNA pobrano po kilkanaście próbek w przedziale czasowym od 0 do 30 godzin inkubacji. Najwięcej próbek pochodzi z trzech pierwszych godzin oraz z dwudziestej i dwudziestej pierwszej godziny inkubacji. Pierwsze trzy godziny były czasem wskazującym na efektywność rybozymu. Jeśli w tym czasie nie pojawiły się wyraźne produkty cięcia, danego rybozymu nie można było uznać za wystarczająco skuteczny względem docelowego substratu. Z kolei pojawienie się lub brak produktów cięcia po 20 godzinach inkubacji ostatecznie weryfikowało określony rybozym jako aktywny lub nieaktywny katalitycznie względem testowanego substratu RNA. Istotny był również stan substratu po tym czasie, gdyż jego ilość powinna wyraźnie spadać. Wyniki cięcia *in vitro* zweryfikowały, który rybozym jest aktywny i na tyle efektywny, aby został zbadany w eksperymentach *in vivo* do cięcia substratu mRNA.

Weryfikacja produktów cięcia

Cząsteczki RNA po inkubacji rozdzielono elektroforetycznie na żelach poliakrylamidowych (Rysunek 30, 31, 33, 34, 36-39). W przypadku wysokiej efektywności rybozemu spodziewano się obecności czterech prążków z danego punktu czasowego. Zaczynając od góry, pierwszy prążek o stałej intensywności wskazuje na rybozym, który nie powinien być degradowany podczas inkubacji w przeprowadzanych warunkach. Drugi, o malejącej intensywności w miarę upływu czasu, określa substrat, który jest rozszczepiany przez rybozym podczas reakcji transestryfikacji. Dwa ostatnie prążki w dolnej części żelu oznaczają produkty cięcia substratu, które wykazują rosnącą intensywność wraz z czasem inkubacji.

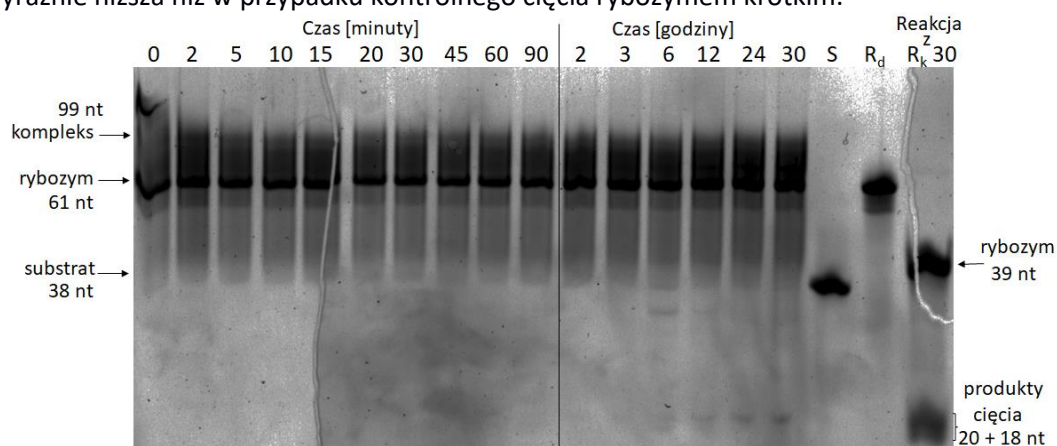
Fragment substratu mRNA_{acpP}

Na rysunku 29 przedstawiono struktury trójwymiarowe kompleksów: S_{acpP}:Rz_{krótki} i S_{acpP}:Rz_{długi}.



Rysunek 29. Kompleksy długiego (Rz_{długi}) i krótkiego (Rz_{krótki}) rybozymbu anty-*acpP* z substratem mRNA_{acpP}.

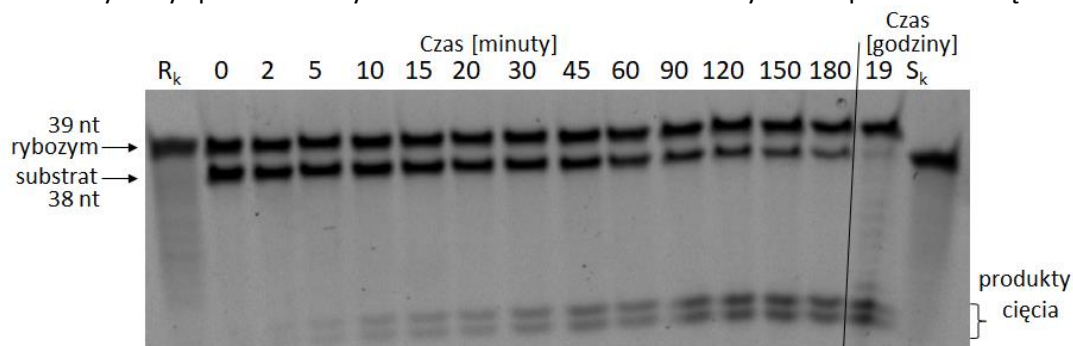
Wyniki inkubacji Rz_{długi} z fragmentem substratu mRNA_{acpP} (Rysunek 30) sugerują, że kompleks S:R jest tak silnie związany, że nie ulega całkowitemu rozdzieleniu w żelu denaturującym, nawet przy równoczesnej obecności w próbce formamidu denaturującego RNA. Ze względu na 2,5-krotny nadmiar rybozymbu względem substratu, prążki RNA wolnego rybozymbu są wyraźnie widoczne. W przypadku prążków wolnego substratu we wszystkich punktach czasowych nie są one intensywne, co wskazuje na ich związanie w kompleksie. Od trzeciej godziny inkubacji można zauważyć delikatne prążki produktów cięcia. Nawet po trzydziestu godzinach inkubacji ilość produktów cięcia mRNA_{acpP} rybozymbem długim jest wyraźnie niższa niż w przypadku kontrolnego cięcia rybozymbem krótkim.



Rysunek 30. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{acpP} przez Rz_{długi} (stosunek 1:2,5) w ciągu 30 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat, R_d – rybozym długi, R_k – rybozym krótki, M –

marker RNA. Kontrola S oraz próbka po reakcji z kontrolnym R_k zostały pobrane po 30 godzinach inkubacji w 37°C.

Wyniki inkubacji z $R_{k\text{krótki}}$ pokazują jego wysoką aktywność względem fragmentu substratu $mRNA_{acpP}$ (Rysunek 31). Produkty cięcia pojawiły się już po dwóch minutach reakcji. W miarę upływu czasu widać wyraźny spadek intensywności substratu i wzrost intensywności produktów cięcia.

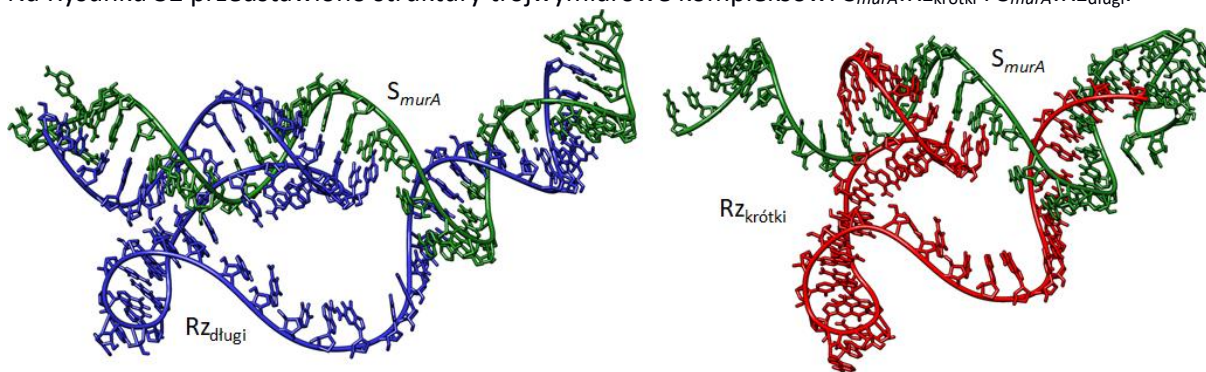


Rysunek 31. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięcia *in vitro* fragmentu substratu $mRNA_{acpP}$ przez $R_{k\text{krótki}}$ (stosunek 1:1) w ciągu 180 minut inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Żel reprezentatywny. Więcej zdjęć żeli z kinetyki w różnych stosunkach molowych S: R_k na Rysunku 39.

Substrat $mRNA_{acpP}$ z miejscem cięcia GUA jest odpowiednim fragmentem do celowania i rozszczepiania go w reakcji transestryfikacji przez zaprojektowany rybozym *hammerhead*. $R_{k\text{krótki}}$ jest znacznie efektywniejszy nawet w krótszym czasie inkubacji (pierwsze produkty cięcia pojawiły się już po dwóch minutach inkubacji) niż $R_{k\text{długi}}$ (pierwsze wyraźne produkty cięcia zaobserwowano dopiero w szóstej godzinie). Możliwe, że zdolność katalityczna $R_{k\text{długi}}$ jest w rzeczywistości większa niż widać na żelu, jednak ze względu na tworzenie bardzo silnego kompleksu nie da się zobaczyć produktów cięcia odseparowanych od substratu.

Fragment substratu $mRNA_{murA}$

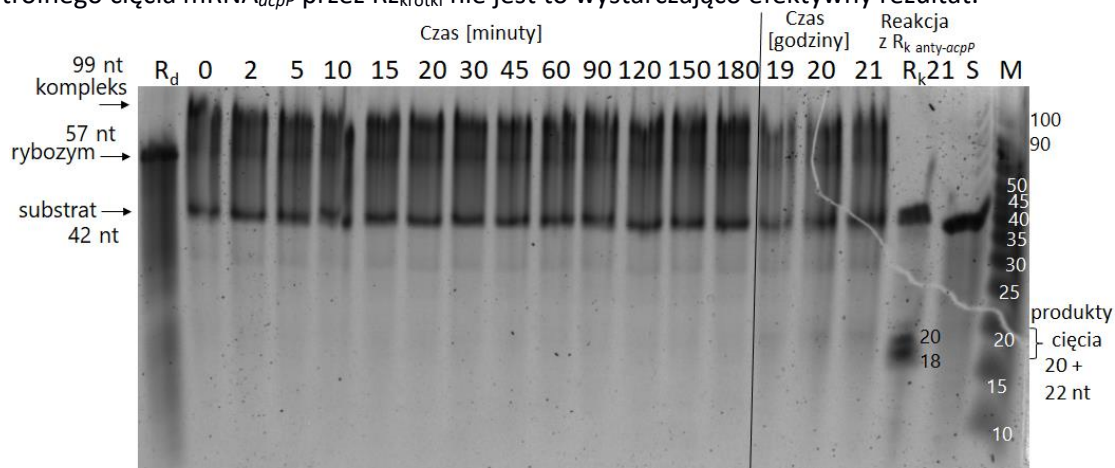
Na Rysunku 32 przedstawiono struktury trójwymiarowe kompleksów: S_{murA} : $R_{k\text{krótki}}$ i S_{murA} : $R_{k\text{długi}}$.



Rysunek 32. Kompleksy długiego ($R_{k\text{długi}}$) i krótkiego ($R_{k\text{krótki}}$) rybozemu anty-*murA* z substratem genu $mRNA_{murA}$.

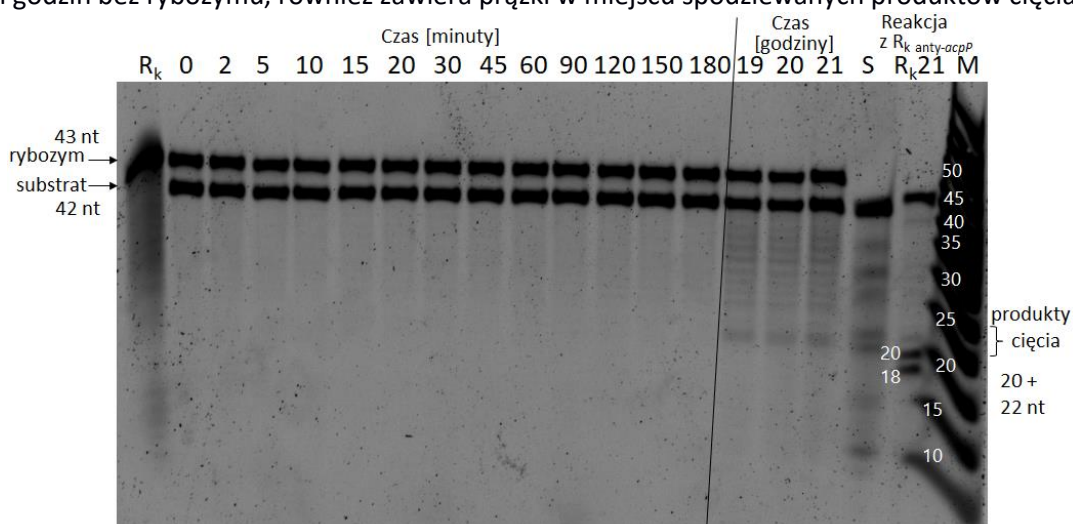
Wyniki inkubacji $R_{k\text{długi}}$ z fragmentem substratu $mRNA_{murA}$ (Rysunek 33) również pokazują utworzenie silnego kompleksu S: R , którego nie można całkowicie rozdzielić na żelu. Nie obserwuje się zmian intensywności prążków kompleksu, wolnego rybozemu i wolnego substratu w miarę upływu czasu. Od dziewiętnastej godziny inkubacji można zaobserwować delikatne prążki w miejscu

oczekiwanych produktów cięcia. Porównując wyniki po dwudziestu jeden godzinach inkubacji do kontrolnego cięcia mRNA_{acpP} przez Rz_{krótki} nie jest to wystarczająco efektywny rezultat.



Rysunek 33. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu in vitro fragmentu substratu mRNA_{murA} przez Rz_{długi} (stosunek 1:1) w ciągu 21 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat, R_k – rybozym krótki, M – marker RNA. Kontrola S oraz próbka po reakcji z kontrolnym R_k_{anty-acpP} (39 nt) zostały pobrane po 21 godzinach inkubacji w 37°C.

Wyniki inkubacji Rz_{krótki} z fragmentem substratu mRNA_{murA} (Rysunek 34) nie świadczą o dobrej aktywności rybozymu. Delikatne prążki w miejscach produktów cięcia widoczne są od dziewiętnastej godziny reakcji. Podobnie jak w przypadku rybozymu długiego efekt cięcia po dwudziestu jeden godzinach inkubacji w porównaniu do kontrolnego cięcia substratu mRNA_{acpP} przez Rz_{krótki} jest bardzo niski. Nie zaobserwowano zmian intensywności prążków wolnego rybozymu i wolnego substratu w miarę upływu czasu. Ścieżka, na której rozdzielono substrat kontrolny inkubowany przez dwadzieścia jeden godzin bez rybozymu, również zawiera prążki w miejscu spodziewanych produktów cięcia.

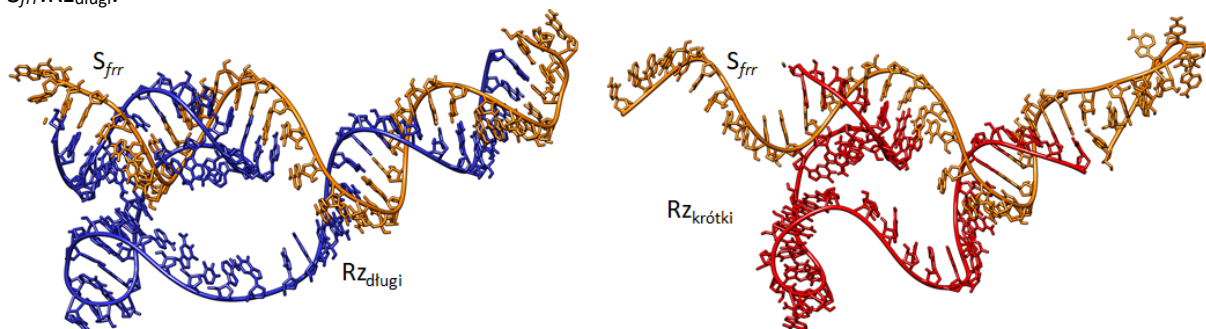


Rysunek 34. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu in vitro fragmentu substratu mRNA_{murA} przez Rz_{krótki} (stosunek 1:1) w ciągu 21 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat, R_k – rybozym krótki, M – marker RNA. Kontrola S oraz próbka po reakcji z kontrolnym R_k_{anty-acpP} (39 nt) zostały pobrane po 21 godzinach inkubacji w 37°C.

Otrzymane wyniki wskazują, że substrat mRNA_{murA} z miejscem cięcia AUA nie jest efektywnie rozszczepiany w reakcji transestryfikacji przez żadną z wersji zaprojektowanego rybozemu *hammerhead*.

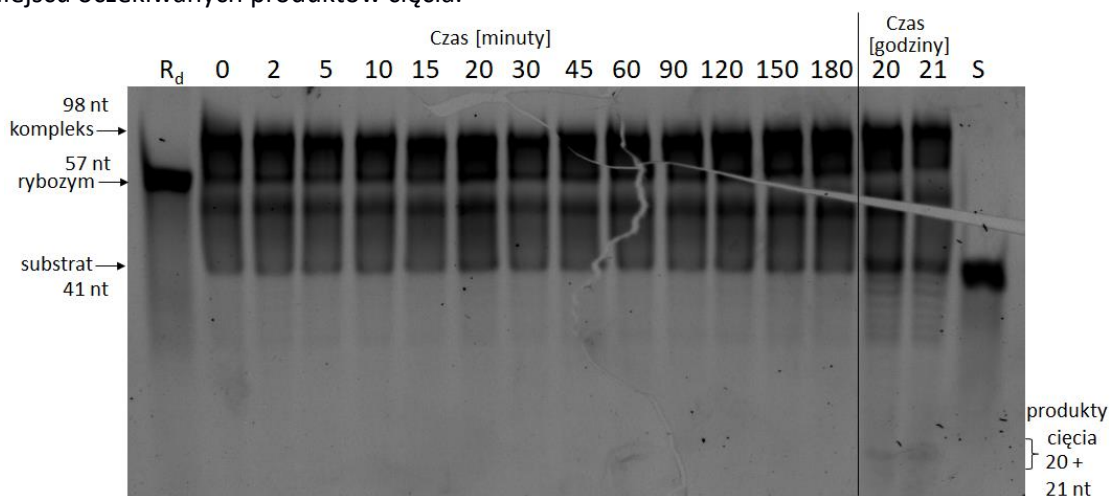
Fragment substratu mRNA_{frr}

Na Rysunku 35 przedstawiono przewidywane struktury trójwymiarowe kompleksów: S_{frr}:Rz_{krótki} i S_{frr}:Rz_{długi}.



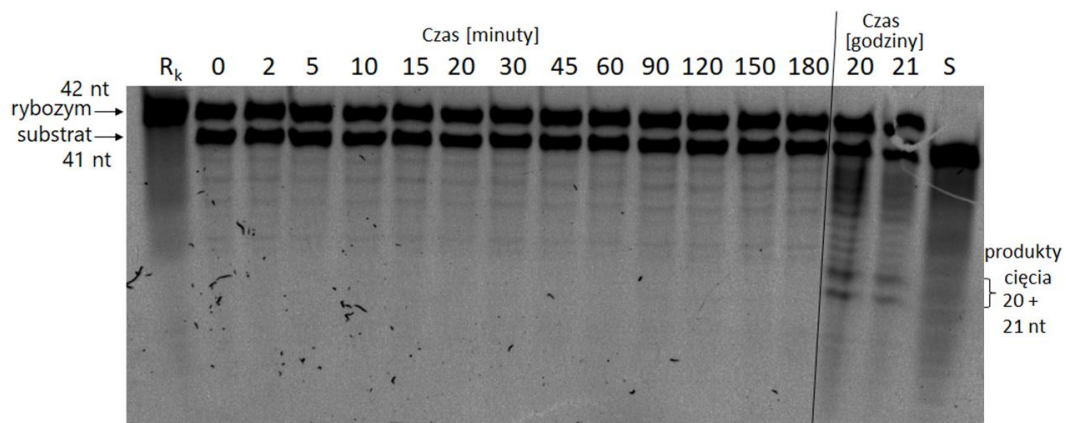
Rysunek 35. Kompleksy długiego (Rz_{długi}) i krótkiego (Rz_{krótki}) rybozemu anty-*frr* z substratem mRNA_{frr}.

Wyniki inkubacji Rz_{długi} z fragmentem substratu mRNA_{frr} (Rysunek 36) również pokazują utworzenie silnego kompleksu S:R, którego nie można całkowicie rozdzielić na żelu. Nie obserwuje się zmian intensywności prążków kompleksu, wolnego rybozemu i wolnego substratu w miarę upływu czasu. W dwudziestej i dwudziestej pierwszej godzinie inkubacji można zaobserwować delikatne prążki w miejscu oczekiwanych produktów cięcia.



Rysunek 36. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{frr} przez Rz_{długi} (stosunek 1:1) w ciągu 21 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat. Kontrola S została pobrana po 21 godzinach inkubacji w 37°C.

Wyniki inkubacji Rz_{krótki} z fragmentem substratu mRNA_{frr} (Rysunek 37) pokazują aktywność rybozemu wyłącznie w próbkach z dwudziestej i dwudziestej pierwszej godziny reakcji w postaci prążków z dwoma produktami cięcia. Intensywności prążków wolnego rybozemu i wolnego substratu w miarę upływu czasu nie ulegają zmianie.

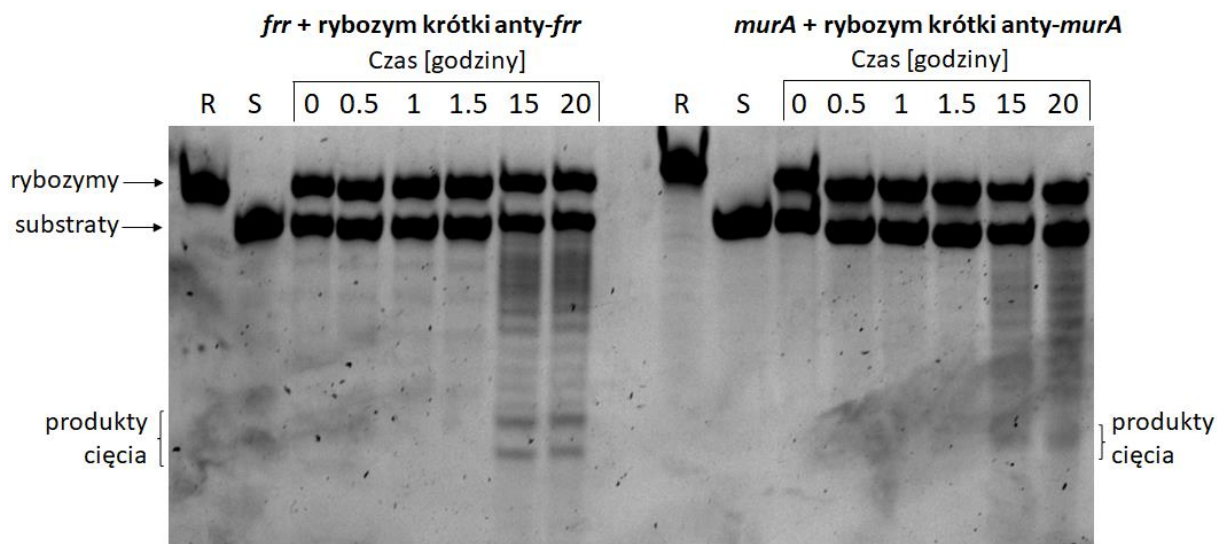


Rysunek 37. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{frr} przez R_{zkrótki} (stosunek 1:1) w ciągu 21 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat, R_k – rybozym krótki, M – marker RNA. Kontrola S została pobrana po 21 godzinach inkubacji w 37°C.

Otrzymane wyniki wskazują, że substrat mRNA_{frr} z miejscem cięcia GUA nie jest wystarczająco efektywnie rozszczepiany w reakcji transestryfikacji przez obydwie wersje zaprojektowanego rybozemu *hammerhead*. Niemniej jednak, R_{zkrótki} wykazuje wyraźnie lepszą aktywność cięcia w dwudziestej i dwudziestej pierwszej godzinie reakcji niż R_{zdługi}.

Fragment substratu mRNA_{frr} i mRNA_{murA}

Powtórzone inkubację kompleksów: S_{frr}:R_{zkrótki} i S_{murA}:R_{zkrótki} w celu bezpośredniego porównania produktów cięcia po 21 godzinach. Wyniki zestawiono na Rysunku 38.

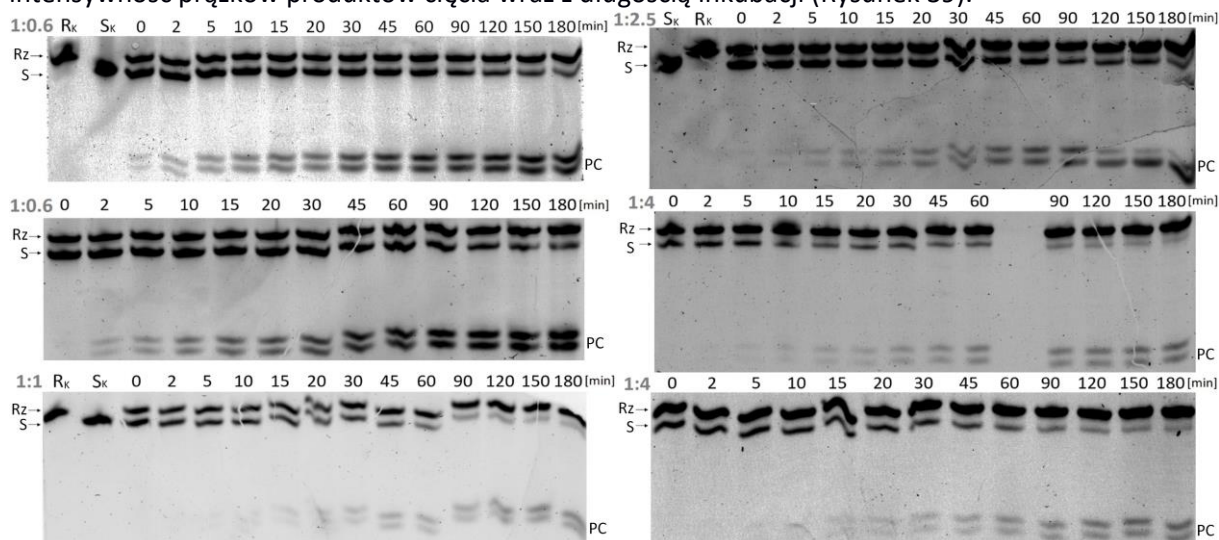


Rysunek 38. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu *in vitro* fragmentów substratów mRNA_{frr} i mRNA_{murA} przez krótkie rybozemy (R) (stosunek 1:1) w ciągu 20 godzin inkubacji na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Kontrole porównawcze: S – substrat, R – rybozym. Kontrole S i R zostały pobrane po 20 godzinach inkubacji w 37°C.

Produkty cięcia fragmentów substratów mRNA_{frr} i mRNA_{murA} zaobserwowano po piętnastu godzinach inkubacji. Po kolejnych pięciu godzinach intensywność prążków nie uległa wzmocnieniu co sugeruje niską efektywność rybozymu. Niemniej jednak produkty cięcia mRNA_{frr} są wyraźnie lepiej widoczne niż w przypadku produktów cięcia mRNA_{murA}. Kolejnym dowodem na niską aktywność rybozymów wobec omawianych substratów jest brak spadku intensywności substratów w czasie. Działanie krótkich rybozymów anty-*frr* i anty-*murA* jest zauważalne, ale nie jest wystarczające, aby zakwalifikować je do dalszych badań.

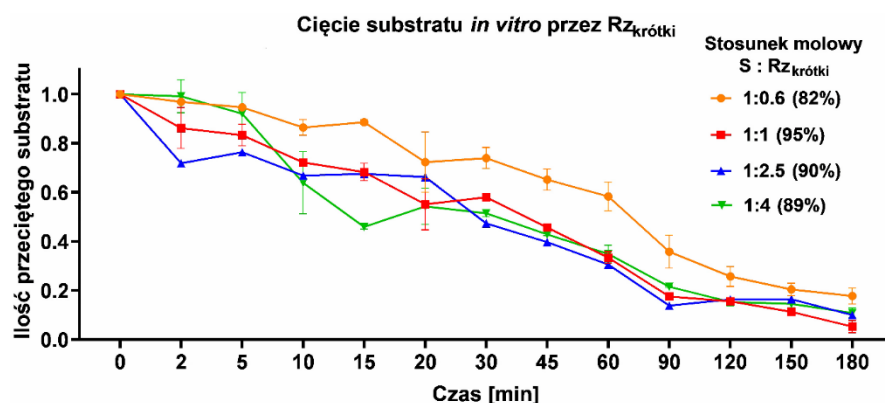
Kinetyka cięcia substratu *acpP* przez krótki wariant rybozymu

Ze względu na wysoką efektywność cięcia mRNA_{*acpP*} przez Rz_{krótki} użyto tej pary do obserwacji kinetyki reakcji *in vitro*. Przeprowadzono reakcje cięcia w czterech stosunkach molowych substratu do rybozymu (1:0,6, 1:1, 1:2,5, 1:4). Rozdział elektroforetyczny RNA po każdej reakcji wykazał stałą intensywność prążków rybozymu, zmniejszającą się intensywność prążków substratu oraz wzrastającą intensywność prążków produktów cięcia wraz z długością inkubacji (Rysunek 39).



Rysunek 39. Rozdział elektroforetyczny RNA po cięciu *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{*acpP*} (S) przez rybozym (Rz) w czasie: 0 – 180 min na 15% denaturującym żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem. Stosunki molowe kompleksów S:R pokazano w lewym górnym rogu każdego żelu. Kontrole porównawcze: S_K – substrat, R_K – rybozym krótki.

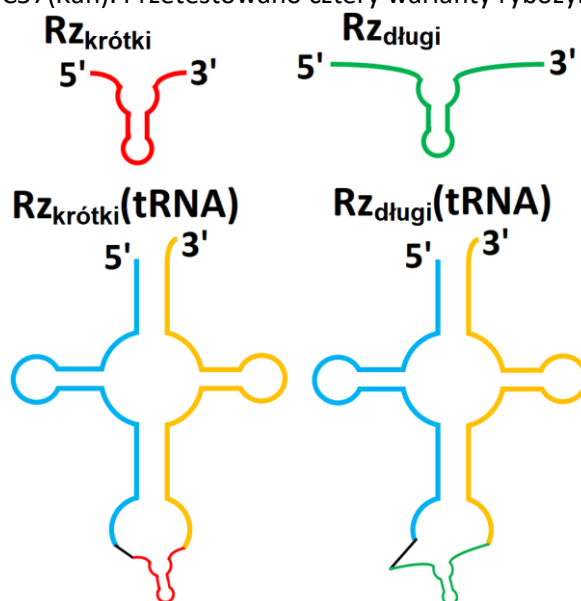
Analiza intensywności prążków wykazała wysoką wydajność cięcia fragmentu mRNA_{*acpP*} krótkim rybozymem w ciągu 180 minut (Rysunek 40). Wydajności reakcji wynosiły od 82% dla stosunku molowego S:R 1:0,6 przez 89% dla 1:4 i 90% dla 1:2,5 do 95% dla 1:1. Wyniki pokazały, że skuteczność cięcia substratu jest największa przy tej samej ilości molowej substratu i rybozymu. Nadmiar rybozymu nie poprawił efektywności cięcia, co potwierdzają dane stechiometryczne ITC (Tabela 6).



Rysunek 40. Cięcie *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{acpP} przez R_k w czterech stosunkach molowych (SM) po 3 godzinach inkubacji. Dane są znormalizowane i pokazują średnią odchylenia standardowego, n = 2 dla 1:0,6, 1:1 oraz 1:4 SM, ale n = 1 dla 1:2,5 SM. W nawiasach umieszczono procent cięcia substratu po 180 minutach inkubacji.

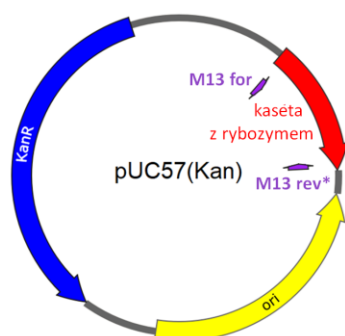
4.3.5 Kasety zawierające rybozym na plazmidzie pUC57(Kan)

Do badań *in vivo* wybrano jeden substrat – mRNA_{acpP}. W celu wprowadzenia rybozymu do bakterii wykorzystano plazmid pUC57(Kan). Przetestowano cztery warianty rybozymu (Rysunek 41).



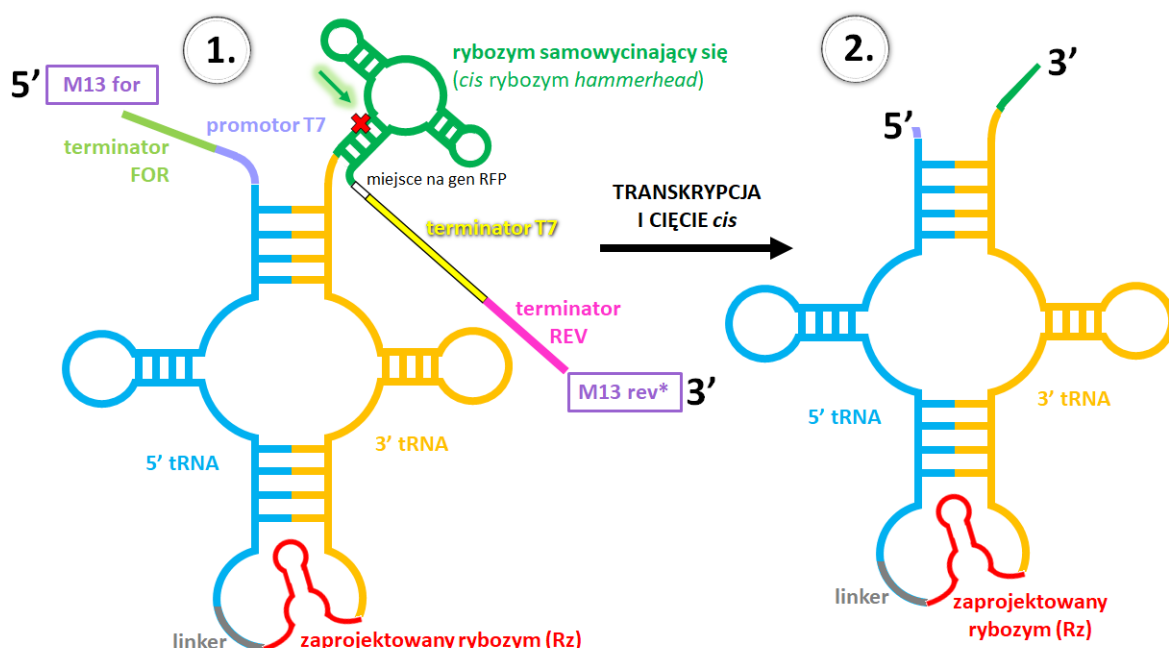
Rysunek 41. Schemat czterech wariantów rybozymu hammerhead (Rz): dwa występujące w samodzielnie (Rz_{krótki}, Rz_{długi}) i dwa ukryte wewnątrz struktury tRNA (Rz_{krótki}(tRNA), Rz_{długi}(tRNA)). Czerwony - Rz_{krótki}, zielony - Rz_{długi}, niebieski – część 5' tRNA, pomarańczowy – część 3' tRNA.

Rybozym został zaprojektowany jako część kasety wklonowanej do wektora plazmidowego (Rysunek 42).



Rysunek 42. Schemat plazmidu z kasetą z rybozymem

W kasetach (Rysunek 43, Tabela 7) znajduje się promotor i terminator polimerazy RNA T7, a także dwa dodatkowe, silne i naturalne terminatory pochodzące z *E. coli*: terminator_for o oryginalnej nazwie *ilvBN* oraz terminator_rev* o nazwie ECK120016882. Ich zadaniem jest zapobiegnięcie ewentualnej syntezy rybozemu lub innych nieplanowanych cząsteczek przez inne polimerazy obecne w komórce bakterii (145). Każda kasetka zawiera kilka struktur (Rysunek 43, Tabela 7), ale jej główną część stanowi Rz o dwóch różnych długościach ramion komplementarnych do sprawdzonej *in vitro* sekwencji substratu mRNA_{acpP} (Tabela 5, Rysunek 41). Obydwa warianty Rz występują w wersji samodzielnej lub ukrytej wewnątrz struktury tRNA w celu ich ochrony przed trawieniem enzymatycznym i degradacją (146) (Rysunek 41). Nazwy kaset zależą od długości ramion Rz i obecności struktury tRNA: Rz_{krótki} (samodzielny Rz z krótkimi ramionami), Rz_{długi} (samodzielny Rz z długimi ramionami), Rz_{krótki}(tRNA) (Rz_{krótki} w strukturze tRNA) i Rz_{długi}(tRNA) (Rz_{długi} w strukturze tRNA). Inne badania wykazały, że sekwencja zawierająca dodatkowy łącznik pomiędzy końcem 5' tRNA, a rybozymem *hammerhead* zwiększa jego aktywność względem substratu mRNA (147). Oryginalny łącznik, na którego sekwencji bazowano (146), zawiera miejsce restrykcyjne EcoRI. Na potrzeby niniejszych badań zmieniono ten fragment, aby pozbyć się ww. miejsca restrykcyjnego. Terminator T7 składa się z 48 nukleotydów. Oznacza to, że po syntezie samego Rz lub Rz z 3' tRNA przez polimerazę T7 na jego końcu 3' zostałyby cała sekwencja terminatora, co mogłoby zakłócać tworzenie kompleksu Rz z substratem mRNA_{acpP}. W celu uniknięcia niechcianego „ogona” terminatora T7, dodano przed nim inną rozszczepiającą się katalitycznie część. Tym dodatkowym narzędziem jest rybozym *hammerhead* o aktywności *in cis*, który wykazał najwyższą efektywność cięcia na końcach 3' spośród przetestowanych rybozymów (148). Część samorozszczepiająca się przeprowadza reakcję transestryfikacji w miejscu cięcia GUC. Sekwencję *cis* rybozemu wstawiono na końcu 3' rybozemu lub tRNA. Po takim autocięciu na końcu 3' pozostaną tylko 3 dodatkowe nukleotydy zamiast 48 nukleotydów terminatora T7. W przypadku braku obserwacji cięcia mRNA_{acpP}, w kasecie przygotowano dodatkową pozycję z miejscami restrykcyjnymi (EcoRI/SpeI) w celu wklonowania genu białka czerwonej fluorescencji (RFP). W takiej sytuacji testowany Rz zostałby przeprojektowany na Rz kontrolny, który celowałby w mRNA_{rfp} zakodowane na DNA plazmidowym zamiast w DNA genomowym. W związku z tym, cel cięcia dla nowego Rz byłby zakodowany na tym samym plazmidzie co mogłoby dać szybsze i łatwiejsze obserwacje cięcia mRNA wewnątrz komórki bakterii. Weryfikacja oraz poziom cięcia mRNA byłby obserwowany za pomocą pomiarów fluorescencji białka RFP (124). Zaprojektowane kasety mają więcej miejsc restrykcyjnych, gdyby zaszła potrzeba zmian fragmentów DNA poprzez trawienie i ligację enzymami restrykcyjnymi. Wszystkie sekwencje przygotowano tak, aby były łatwe do zmiany za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).



Rysunek 43. 1. Schemat kasety z rybozymem na przykładzie $Rz_{krótki}$ (tRNA) zakodowanym na plazmidzie pUC57(Kan). Kolory fragmentów odpowiadają kolorom sekwencji w Tabeli 7. Nie pokazano miejsc enzymów restrykcyjnych. Zielona strzałka i czerwony krzyżyk wskazują miejsce cięcia części samowycinającej się. **2.** Pożądana struktura Rz w tRNA, po transkrypcji z plazmidu i autorozszczepieniu dodatkowego cis rybozomu *hammerhead*, gotowa do celowania i cięcia substratu mRNA_{acpP}.

Tabela 7. Ogólny schemat i sekwencje kaset z rybozymami na plazmidzie pUC57(Kan). Terminator_rev* oraz M13_rev* są zakodowane na nici komplementarnej od końca 5' do 3'. Nazwy bez tła odnoszą się do enzymów restrykcyjnych. CCCCCCAAAAAA – dodatkowa sekwencja pomiędzy enzymami restrykcyjnymi do ewentualnej zmiany na gen białka RFP.

Ogólny schemat sekwencji kasety z rybozymem – nić wiodąca 5' → 3'	
FspI –	M13_for – SphI – Terminator_for – promoter T7 – 5'tRNA+linker – rybozym hammerhead –
3'tRNA –	rybozym samowycinający się – EcoRI – CCCCCCAAAAAA – SpeI – terminator T7 –
Terminator_rev* –	AgeI – M13_rev* – PciI
Terminator_for (ilvBN terminator naturalny)	
Terminator_rev* (ECK120016882 terminator naturalny)	
Sekwencja kasety z Rz_{short} – nić wiodąca 5' → 3'	
TGCGCA	GTAAAACGACGGCCAGTGCATGCAAGACCCCCGCACCGAAAGGTCCGGGGGTTTTTTTAAATACGA
CTCACTATAG	GTGCTCACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAAACTCTTAAAGTCCTCTACGAAAGTAGAGCTGAT
GAGAGCGAAAGCTCGAAAC	GAATTCCCCCAAAAAAACTAGTCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGG
GTCTTGAGGGGTTTTTTG	CATAAAAAAACCCGCTTGCGCGGGGCTTTTTTCACAACCGGTGTCATAGCTGTTTCCT
GACATGT	
Sekwencja kasety z Rz_{long} – nić wiodąca 5' → 3'	
TGCGCA	GTAAAACGACGGCCAGTGCATGCAAGACCCCCGCACCGAAAGGTCCGGGGGTTTTTTTAAATACGA
CTCACTATAG	GACTTCGATAGTGCTCACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAAACTCTTAAATTTCTATCGGTCTCT
CTACGAAAGTAGAGCTGAT	GAGAGCGAAAGCTCGAAACGAATTCCCCCAAAAAAACTAGTCTAGCATAAAC
CCTTGGGGCCTCTAAACGGG	CTTGAGGGGTTTTTTG CATAAAAAAACCCGCTTGCGCGGGGCTTTTTTCACAACC
GGT	GTCATAGCTGTTTCCTGACATGT

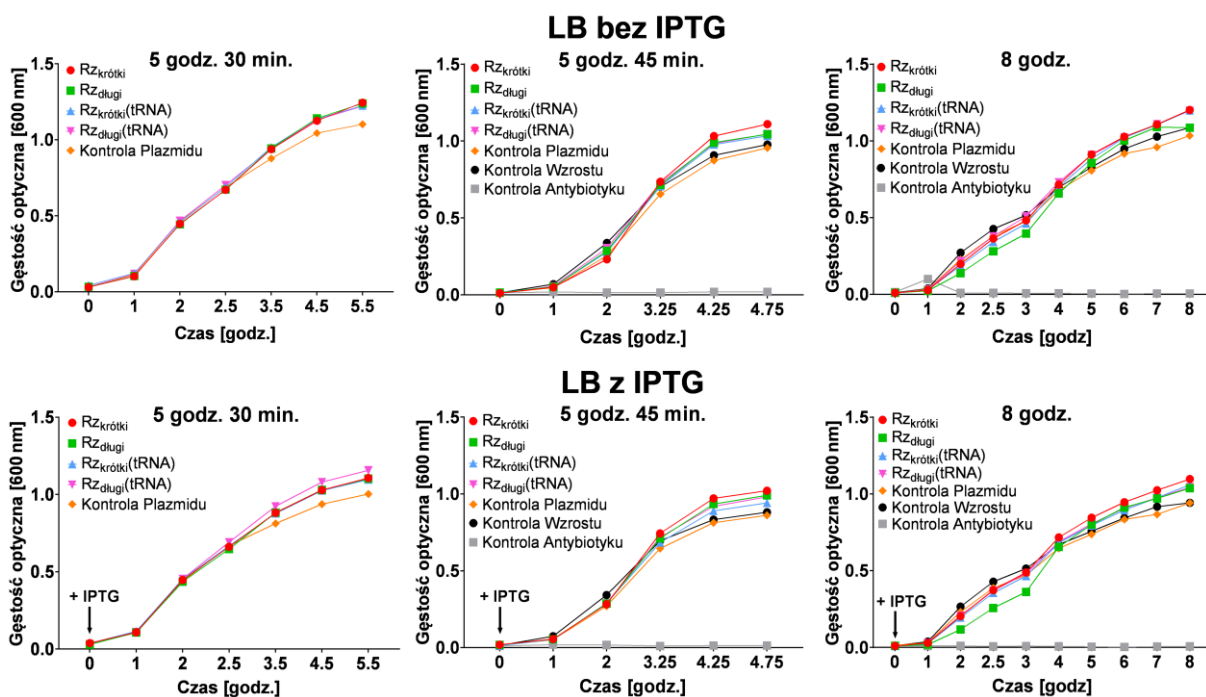
Sekwencja kasety z Rz_{short}(tRNA) – nić wiodąca 5' → 3'	
TGCGCA	GTAAACGACGGCCAGTGCATGCAAGACCCCCGCACCGAAAGGTCCGGGGGTTTTTTTTTAATACGA
CTCACTATAGGCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGCGGCCGTACTT	CCACCAACGAGTCCAAGTCTCACTG
ATGAGGCCGAAAGGCCGAAAACCTCTAAA	TAATACGGCCGCGGGTCCAGGGTTCAAGTCCCTGTTTCGGGCGC
CGTCCTCTACGAAAGTAGAGCTGATGAGAGCGAAAGCTCGAAAC	GAATTCCCCCCAAAAAAAGTCTAGC
ATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGCATAAAAAAACCCGCTTGC	CGGGGCTTTTTC
ACAACCGGTGTCATAGCTGTTTCCTG	ACATGT
Sekwencja kasety z Rz_{short}(tRNA) – nić wiodąca 5' → 3'	
TGCGCA	GTAAACGACGGCCAGTGCATGCAAGACCCCCGCACCGAAAGGTCCGGGGGTTTTTTTTTAATACGA
CTCACTATAGGCCCGGATAGCTCAGTCGGTAGAGCAGCGGCCGTACTT	CCACCAACGAGTCCAAGTCTCGATA
GTGCTCACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAAACCTCTAAATTTCTATCG	TAATACGGCCGCGGGTCCAGGGTT
CAAGTCCCTGTTTCGGGCGCC	GTCTCTACGAAAGTAGAGCTGATGAGAGCGAAAGCTCGAAACGAATTC
CCAAAAAAGTCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGCATAAAAAAAC	CCGCTTGC
CGGGGCTTTTTCACA	ACCGGTGTCATAGCTGTTTCCTGACATGT

4.3.6 Aktywność rybozomu w pożywce LB w szklanych probówkach

Po potwierdzeniu cięcia *in vitro* fragmentu substratu mRNA_{acpP} przez zaprojektowany Rz, przetestowano potencjał cięcia jego obydwu wersji w komórce bakterii. Po transformacji plazmidów zawierających Rz do komórek *E. coli* BL21(DE3) przeprowadzono eksperymenty mające na celu zaobserwowanie cięcia mRNA_{acpP}. Prowadzono cztery hodowle bakterii zawierające plazmid kodujący jeden z rybozymów: Rz_{krótki}, Rz_{długi}, Rz_{krótki}(tRNA), Rz_{długi}(tRNA) i dwie hodowle kontrolne: jedną zawierającą bakterie z plazmidem bez Rz (Kontrola Plazmidu - KP) i drugą zawierającą bakterie bez plazmidu (Kontrola Wzrostu - KW). W pierwszych eksperymentach sprawdzono również działanie antybiotyku na hodowli bakterii bez plazmidu (Kontrola Antybiotyku - KA). Każda z wymienionych hodowli była prowadzona w dwóch „egzemplarzach” w ramach jednego eksperymentu. Do jednej grupy dodano IPTG, zaś drugą inkubowano bez jego dodatku. Oczekiwano zbliżonego wzrostu bakterii we wszystkich hodowlach bez dodatku induktora IPTG (poza KA). Obecność IPTG powinna spowodować ekspresję genu w komórkach bakterii, a w konsekwencji syntezę Rz przez polimerazę T7 RNA. W grupie hodowli z IPTG podobny wzrost powinny osiągać bakterie kontrolne: KP oraz KW. W przypadku aktywności Rz w grupie z dodatkiem IPTG spodziewano się zahamowania lub słabszego wzrostu bakterii zawierających jeden z czterech Rz w porównaniu do KW i KP. Pożądanym wynikiem jest powtarzalność gęstości optycznej wzrostu bakterii bez Rz, szczególnie hodowli KW między grupami z IPTG i bez IPTG. Dałoby to dowód, że oczekiwane hamowanie wzrostu hodowli z Rz jest wynikiem ich aktywności, a nie obciążenia bakterii induktorem lub plazmidem.

Aktywność rybozomu w pożywce LB z IPTG dodanym na początku hodowli

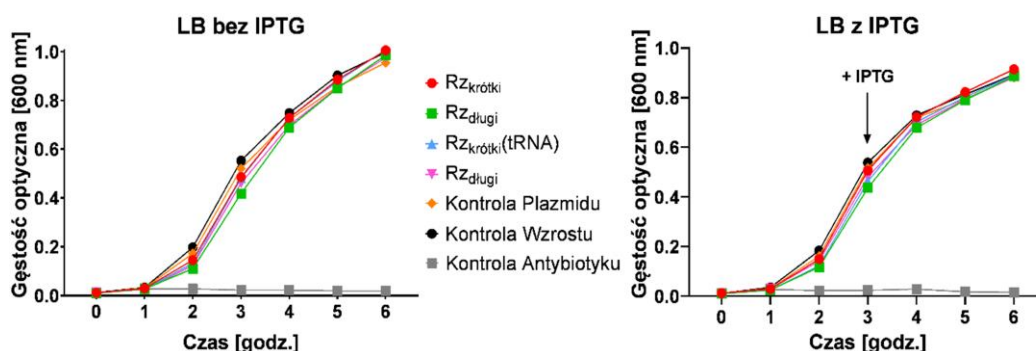
Eksperyment w pożywce LB (Rysunek 44) nie wykazał różnic we wzroście bakterii w hodowlach prowadzonych bez dodatku IPTG. W przypadku dodania IPTG do pożywki na początku hodowli również nie zaobserwowano oczekiwanego efektu od Rz. Porównując wzrost bakterii pomiędzy hodowlami z i bez IPTG prowadzonymi w tym samym czasie, widać, że w ostatnim punkcie czasowym zmierzona gęstość optyczna bakterii w grupie z dodatkiem IPTG jest średnio o 0,1 niższa niż w grupie bez IPTG. Oznacza to, że dodanie IPTG na początku hodowli obciąża komórki bakterii osłabiając ich wzrost o średnio 11%. We wszystkich przypadkach KA wyszła zgodnie z oczekiwaniami hamując wzrost bakterii.



Rysunek 44. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce LB. IPTG dodano na początku hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, n = 1.

Aktywność rybozymu w pożywce LB z IPTG dodanym w trakcie hodowli

Powtórzono eksperyment w pożywce LB z dodaniem IPTG w trakcie hodowli, aby bakterie miały szansę osiągnąć fazę wzrostu bez obciążenia i ten sposób stosowano w kolejnych eksperymentach w szklanych probówkach (Rysunek 45). Również tym razem nie zaobserwowano różnic we wzroście bakterii zawierających Rz. Podobnie jak w przypadku dodania IPTG na początku hodowli, zmierzona gęstość optyczna bakterii w ostatnim punkcie czasowym jest mniejsza o średnio 10,5% w stosunku do grupy bez IPTG.



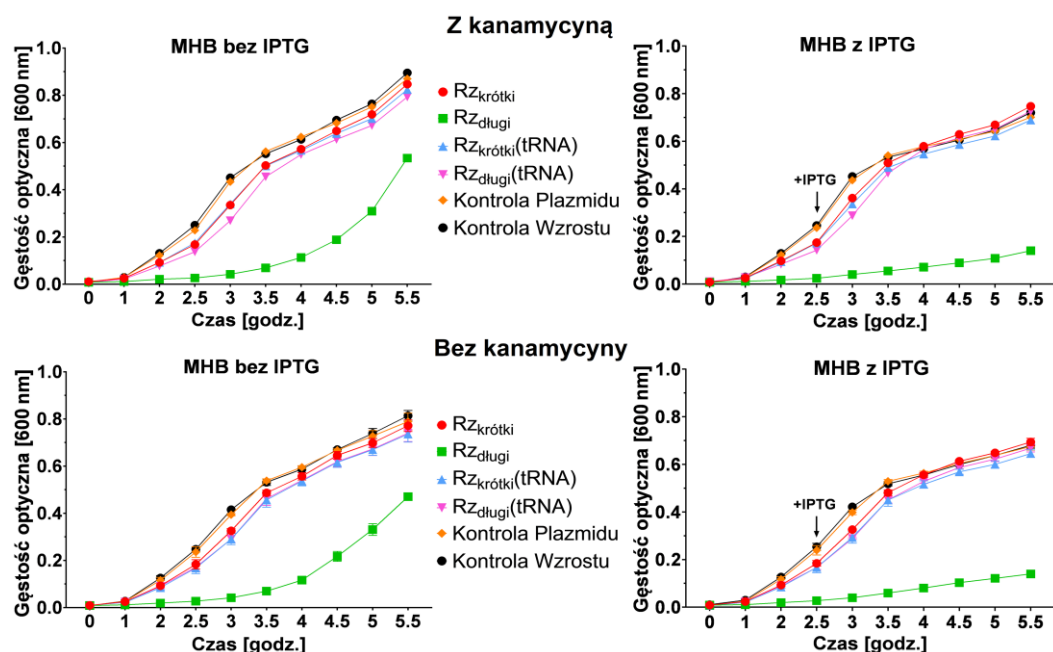
Rysunek 45. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce LB. IPTG dodano po 3 godzinach hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, n = 1.

Wyniki sugerują, że pożywka LB jest zbyt bogatą pożywką dla bakterii, co skutecznie uniemożliwia obserwację potencjalnej aktywności Rz lub Rz nie wykazuje oczekiwanej aktywności *in vivo*.

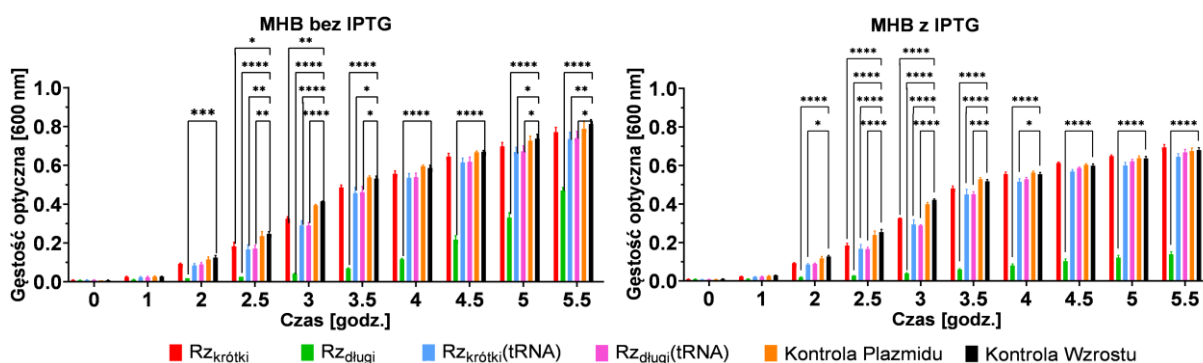
4.3.7 Aktywność rybozemu w pożywce MHB w szklanych probówkach

Aktywność rybozemu z i bez dodatku kanamycyny

W celu utrzymania populacji bakterii zawierających plazmid kodujący oporność na antybiotyki, do pożywki dodaje się ten sam antybiotyk. Pożywka MHB jest specjalnym podłożem do badań wrażliwości bakterii na związki przeciwdrobnoustrojowe (49). Jednak w celu otrzymania bardziej wiarygodnych wyników działania potencjalnego środka przeciwbakteryjnego, lepiej by było wykonać eksperyment w pożywce bez antybiotyku, aby uniknąć jakiegokolwiek jego wpływu na reakcję katalizowaną przez Rz. Dowiedziono, że antybiotyki aminoglikozydowe, w tym używana w badaniach kanamycyna (Kan), mogą wiązać Rz, blokując przeprowadzanie przez niego reakcji transestryfikacji (149,150). W związku z tym, przeprowadzono dwa rodzaje eksperymentów w pożywce MHB, z dodatkiem Kan i bez Kan. Sprawdzono, czy istnieją różnice we wzroście bakterii w podłożu z lub bez Kan, aby ocenić, czy konieczne jest dodawanie antybiotyku do pożywki (Rysunek 46, 47). Wyniki nie wykazały dużych odstępstw wartości gęstości optycznej pomiędzy grupami bez IPTG z i bez Kan oraz grupami zawierającymi IPTG w obecności i przy braku Kan. Średnia różnica wyniosła 4% na korzyść hodowli z Kan. W związku z tym zdecydowano się na kontynuację doświadczeń bez dodawania antybiotyku do pożywki w badaniach *in vivo*. Porównując gęstość optyczną z ostatniego punktu czasowego między grupami z i bez IPTG można dostrzec wyraźne obciążenie komórek bakteryjnych tym induktorem. Obciążenie to obliczone na podstawie porównań KW oraz KP wynosi średnio 18%. W przypadku zastosowania pożywki MHB widać dużo niższy wzrost bakterii zawierających Rz_{długi}. Jest to obserwowane niezależnie od dodatku IPTG. Niemniej jednak, w jego obecności bakterie rosną dużo wolniej. Po 5,5 godzinach hodowli bez IPTG gęstość optyczna bakterii z Rz_{długi} jest prawie 4-krotnie większa niż w hodowli z IPTG. Znaczne spowolnienie wzrostu bakterii zawierających Rz_{długi} przez pierwsze 3,5 godziny w pożywce bez dodatku IPTG, a więc bez uruchomienia procesu syntezy rybozemu z plazmidu, nie daje jednoznacznego potwierdzenia aktywności tego rybozemu. W związku z tym, nie ma pewności, że niższa gęstość optyczna po 5,5 godzinach hodowli z dodatkiem IPTG jest spowodowana cięciem mRNA przez rybozym, a nie tylko większym obciążeniem spowodowanym przez induktor. Mimo zastosowania dobrego systemu do kontroli ekspresji genów i rybozemu, należy wziąć pod uwagę możliwość ewentualnego „przeciekania” promotora polimerazy T7 RNA nawet bez obecności IPTG.



Rysunek 46. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce MHB z dodatkiem lub bez Kan. IPTG dodano po 2,5 godzinach hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, n = 1. Pokazano średnie wartości (dla eksperymentów bez Kan), n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. W przypadku eksperymentów z Kan, n = 1.

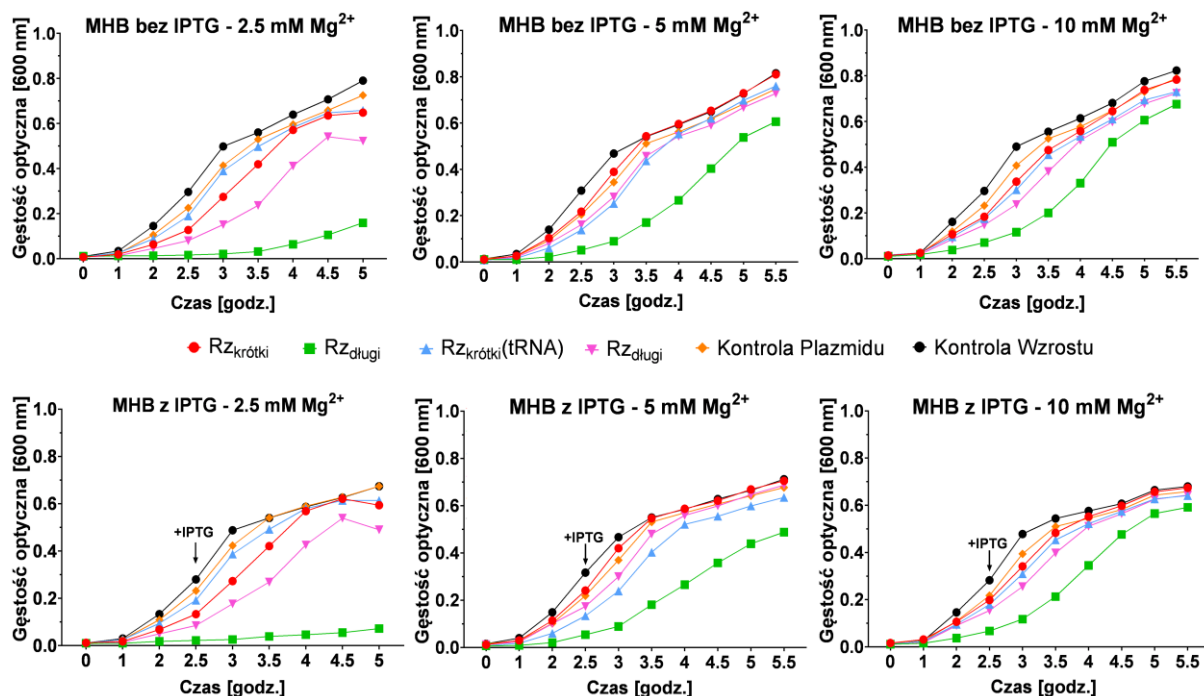


Rysunek 47. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce MHB bez Kan bez i z IPTG. IPTG dodano po 2,5 godzinach hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej zmierzonej dla bakterii zawierających różne plazmidy w porównaniu z kontrolą wzrostu są istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), inne różnice nie są znaczące.

Aktywność rybozymu w różnych stężeniach jonów magnezu

Badania *in vitro* potwierdziły, że jony magnezu są niezbędne do uzyskania aktywnej struktury Rz do cięcia substratu RNA (77). Aktywność katalityczna Rz *in vitro* wzrasta wraz ze wzrostem stężenia magnezu (78). W związku z tym, sprawdzono wpływ stężenia jonów magnezu na wydajność cięcia mRNA przez rybozymy *in vivo*. Przetestowano trzy stężenia magnezu (2,5, 5 i 10 mM) jako dodatek do pożywki MHB. Wyniki *in vivo* wykazały, że im wyższe stężenie magnezu w pożywce, tym niższy efekt hamowania wzrostu bakterii zawierających RZdługi, nawet po dodaniu IPTG (Rysunek 48). Zaobserwowano odwrotny wpływ nadmiaru jonów magnezu na skuteczność cięcia w porównaniu do przytoczonych danych z cięcia RNA *in vitro* (77,78), o ile zahamowanie wzrostu pochodzi z aktywności

rybozemu. W tym przypadku również widać wolniejszy wzrost bakterii z $Rz_{długi}$ nawet przy braku IPTG w pożywce. Jony magnezu znacząco wpływają na efektywność cięcia RNA *in vitro*, jednak w eksperymentach *in vivo* zdecydowanie wspierają wzrost bakterii, co jest spowodowane wykorzystaniem magnezu jako kofaktora wielu reakcji metabolicznych. W związku z tym, zrezygnowano z dodawania magnezu do pożywki w dalszych eksperymentach.

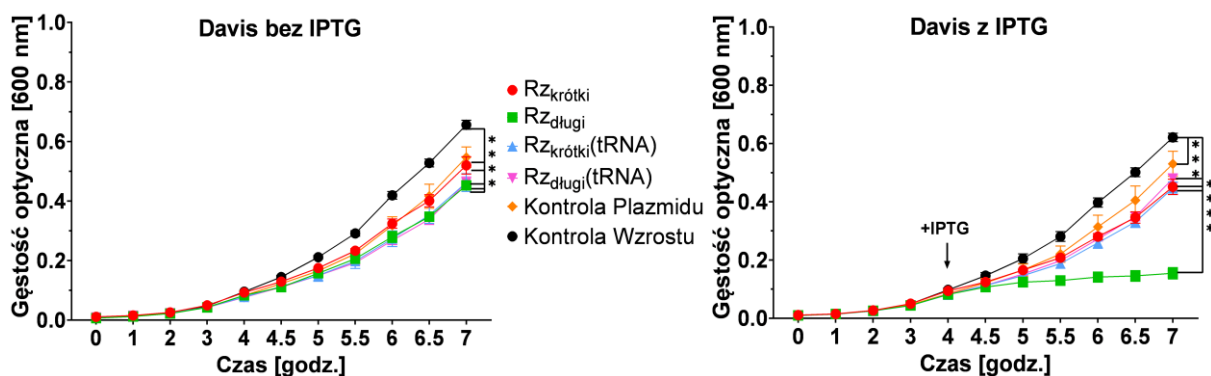


Rysunek 48. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w $mRNA_{acpP}$. Bakterie hodowano w pożywce MHB w trzech stężeniach jonów magnezu (2,5, 5 i 10 mM). IPTG dodano po 2,5 godzinie hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, $n = 1$.

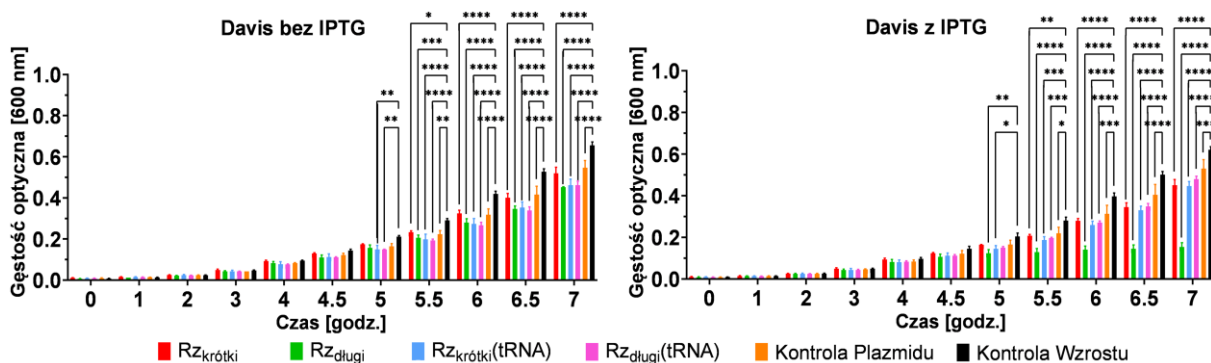
4.3.8 Aktywność rybozemu w pożywce Davisa w szklanych probówkach

Eksperyment powtórzono w pożywce Davisa. Jest to pożywka minimalna zawierająca tylko niezbędne składniki odżywcze do wzrostu szczepów *E. coli* (140). Ze względu na ubogi skład pożywki spodziewano się, że bakterie będą rosły wolniej niż w pożywkach LB i MHB. Z tego powodu, bakterie w niej hodowane mogą być bardziej wrażliwe na działanie rybozemu.

Zgodnie z oczekiwaniami wzrost bakterii był opóźniony w stosunku do ich wzrostu w pożywkach LB i MHB. Hodowla bakterii zawierających $Rz_{długi}$ w pożywce bez induktora utrzymała zbliżoną krzywą wzrostu względem krzywych reszty bakterii zawierających inne Rz (Rysunek 49, 50). Po dodaniu induktora do drugiej grupy od razu zaobserwowano zahamowanie wzrostu bakterii z $Rz_{długi}$, które utrzymało się do końca czasu pomiaru. Wynik ten wskazuje na aktywność rybozemu ściśle kontrolowaną indukcją przez IPTG.



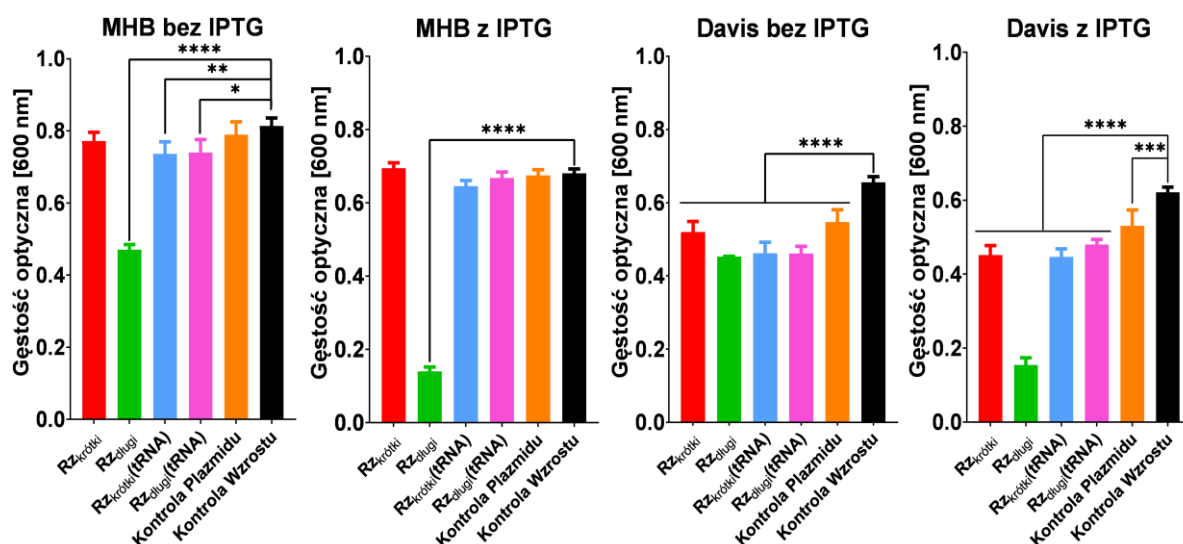
Rysunek 49. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP} – kinetyka wzrostu. Bakterie hodowano w pożywce Davisa bez Kan oraz bez i z IPTG. IPTG dodano po 4 godzinach hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice wartości gęstości optycznej zmierzonej dla bakterii zawierających różne plazmidy w porównaniu z kontrolą wzrostu są istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001), inne różnice nie są znaczące.



Rysunek 50. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP} – wykresy słupkowe. Bakterie hodowano w pożywce Davisa bez Kan bez i z IPTG. IPTG dodano po 4 godzinach hodowli. Eksperyment przeprowadzono w szklanych probówkach. Pokazano średnie wartości, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice wartości gęstości optycznej zmierzonej dla bakterii zawierających różne plazmidy w porównaniu z kontrolą wzrostu są istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), inne różnice nie są znaczące.

4.3.9 Aktywność rybozymu w pożywce MHB i Davis – ostatnie godziny

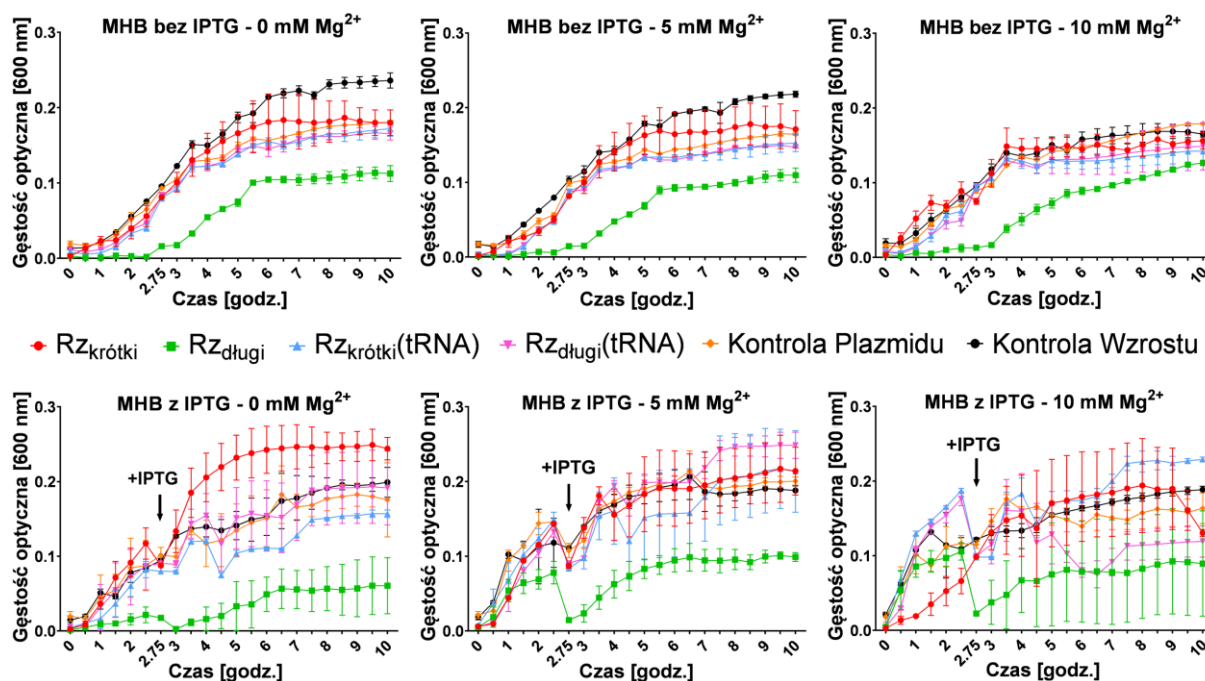
Porównanie gęstości optycznej z ostatnich godzin pomiarów (5,5 godzin pożywce MHB oraz 7 godzin w pożywce Davisa) (Rysunek 51) pokazuje, że bogatsza pożywka MHB wspomaga wzrost bakterii, ale to w niej bakterie wydają się być bardziej obciążone dodatkiem induktora. Bez względu na dodatek IPTG w pożywce MHB obserwowany jest słabszy wzrost bakterii z Rz_{długi} w przeciwieństwie do wyraźnej różnicy ich wzrostu w pożywce Davisa. Właśnie ta różnica pozwala stwierdzić aktywność rybozymu względem bakteryjnego mRNA. Mimo wysokiej istotności statystycznej rybozymów względem KW w pożywce Davisa bez IPTG wynik ten nie sugeruje działania rybozymów po porównaniu odpowiadających im gęstości optycznych w grupie w Davis z induktorem. Biorąc pod uwagę fakt, że KP w pożywce Davisa zarówno z, jak i bez IPTG, również jest wysoce istotna statystycznie, może to oznaczać obciążenie bakterii samą obecnością plazmidu w komórkach. Obecność wysokokopijnego plazmidu i hodowla w uboższym środowisku pozwala na zaobserwowanie wpływu plazmidu na wzrost bakterii w przeciwieństwie do ich wzrostu w pożywce MHB.



Rysunek 51. Porównanie aktywności rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Pokazano wartości gęstości optycznych z ostatnich godzin hodowli w szklanych probówkach: 5,5 godz. dla MHB (Rysunek 45, 46) i 7 godz. dla Davis (Rysunek 48, 49). Pokazane są średnie wartości, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako błąd standardowy średniej. Różnice we wzroście bakterii zawierających plazmid w odniesieniu do Kontroli Wzrostu są: statystycznie istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), reszta różnic nie jest istotna.

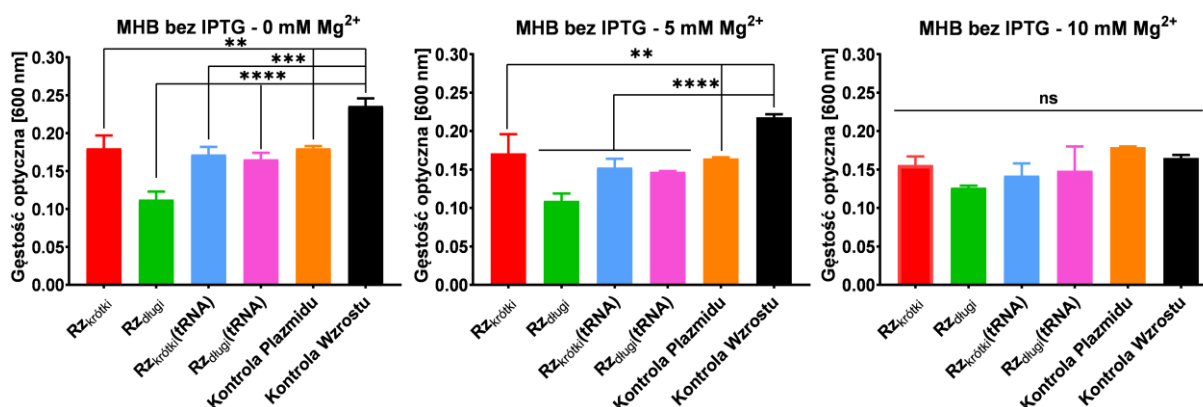
4.3.10 Aktywność rybozymu w pożywce MHB w mikropłytkce – 10 godzin

Eksperymenty przeprowadzono również w mikropłytkach w dłuższym czasie – 10 (Rysunek 52) lub 24 godzin (Rysunek 54-56). Pierwsze doświadczenie w pożywce MHB zostało przeprowadzone z 5 lub 10 mM magnezu oraz bez niego, z IPTG dodanym po 2 godzinach i 45 minutach hodowli (Rysunek 52). Hodowle bakterii bez IPTG bez magnezu oraz w jego stężeniu 5 mM rosły bardzo porównywalnie. Obecność 10 mM jonów magnezu w hodowlach bez IPTG spowodowała niższy wzrost kontroli wzrostu w porównaniu do niższych stężeń magnezu, ale równocześnie zauważalnie lepszy wzrost bakterii z RZ_{dlugi} od 7 godziny. Jednak w czasie całej 10 godzinnej kinetyki, bez względu na obecność IPTG, wzrost bakterii z RZ_{dlugi} był słabszy względem reszty hodowli we wszystkich przypadkach. Po dodaniu IPTG nastąpiło załamanie się krzywych wzrostu, a wartości gęstości optycznych wykazały bardzo duże błędy. Ze względu na to, zdecydowano, że IPTG nie może być dodawane w trakcie trwania pomiaru w mikropłytkce.



Rysunek 52. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce MHB bez Kan, bez lub z dodatkiem: IPTG i jonów magnezu. IPTG dodano po 2 godzinach i 45 minutach hodowli. Eksperyment przeprowadzono 10 godzin w mikropłytkę. Pokazano średnie wartości, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Istotność statystyczną z ostatniej godziny hodowli przedstawiono na Rysunku 53. Ze względu na tak duże błędy po dodaniu IPTG zrezygnowano z liczenia istotności statystycznej dla tej grupy.

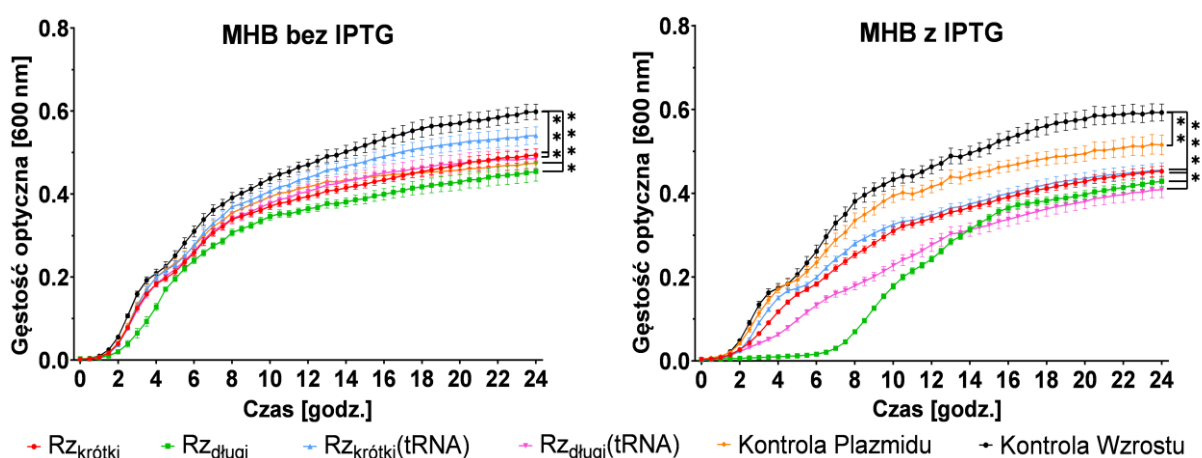
Porównując ostatnią godzinę hodowli bakterii bez IPTG widać, że mniejsze stężenie magnezu powoduje większe różnice pomiędzy kontrolami wzrostu, a poszczególnymi bakteriami zawierającymi plazmidy z Rz (Rysunek 53). Wyniki te wskazują na wysokie wykorzystanie jonów magnezu przez bakterie do poprawy ich wzrostu.



Rysunek 53. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP} po 10 godzinach hodowli bakterii *E. coli* BL21(DE3) w pożywce MHB bez Kan i IPTG z dodatkiem lub bez jonów magnezu (5, 10 mM). Pokazano średnie wartości, n = 2, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice we wzroście bakterii zawierających plazmid w porównaniu z Kontrolą Wzrostu są: istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01), ns - nie są istotne statystycznie.

4.3.11 Aktywność rybozomu w pożywce MHB w mikropłytkce – 24 godziny

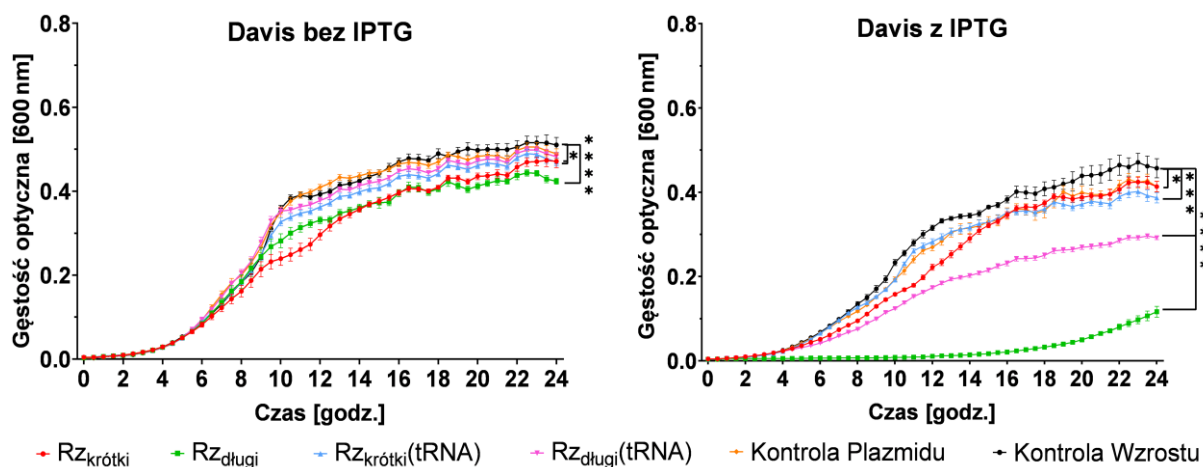
Przeprowadzono 24-godziną kinetykę wzrostu bakterii w pożywce MHB, bez Kan i jonów magnezu (Rysunek 54). Tym razem induktor IPTG został dodany przed rozpoczęciem pomiaru. Najwyższą gęstość optyczną w ciągu całego czasu pomiaru zaobserwowano dla KW. Krzywe wzrostu wszystkich hodowli miały podobny przebieg w grupie bez IPTG. Po 24 godzinach wszystkie hodowle, poza R_{zkrótki}(tRNA) wykazały istotne statystycznie różnice względem KW. Hodowla z R_{zdługi} jest wyraźnie wolniejsza tylko do 4-tej godziny w stosunku do reszty. Jest to podobny wyniki w porównaniu z danymi otrzymanymi z pomiarów w szklanych probówkach. W grupie z induktorem IPTG największe różnice krzywej wzrostu występują w hodowlach bakterii z R_{zdługi} i R_{zdługi}(tRNA) między 2, a 13 godziną inkubacji. Krzywe fazy logarytmicznej R_{zkrótki} i R_{zkrótki}(tRNA) są bardziej płaskie niż w pożywce bez induktora. Zmierzona gęstość optyczna KP jest wyższa od gęstości bakterii zawierających plazmid z dowolnym rybozymbem. Obserwacja ta, wskazuje, że hamowanie wzrostu bakterii wynika z aktywności rybozomu. Krzywe wzrostu, że w komórkach bakterii najlepiej działają R_{zdługi} i R_{zdługi}(tRNA).



Rysunek 54. Aktywność rybozymbów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce MHB pod kontrolą IPTG przez 24 godziny. IPTG dodano na początku eksperymentów. Pokazano średnie wartości, n = 6-18, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice we wzroście bakterii zawierających plazmid w porównaniu z Kontrolą Wzrostu są: istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), reszta nie jest istotna.

4.3.12 Aktywność rybozomu w pożywce Davisa w mikropłytkce przez 24 godzin hodowli

W pożywce Davisa krzywe wzrostu bakterii w grupie bez IPTG są do siebie bardziej zbliżone niż w przypadku wzrostu w pożywce MHB (Rysunek 55). W godzinach 9-13 obserwuje się wyraźnie mniejszy wzrost bakterii z rybozymbem R_{zkrótki}, nawet w porównaniu do R_{zdługi}. Jednak z porównania wartości z ostatniego punktu czasowego wynika, że hodowla z R_{zdługi} wykazuje największy spadek gęstości optycznej w tym punkcie. W grupie z dodatkiem induktora IPTG krzywe w fazie wzrostu logarytmicznego są bardziej pochyle niż bez niego. Obserwuje się również zahamowanie wzrostu dla bakterii z R_{zdługi} przez 13 godzin hodowli i wejście w fazę logarytmiczną po 16 godzinach hodowli. Jednak w trakcie 24 godzin pomiaru nie można zaobserwować wypłaszczenia charakterystycznego dla fazy stacjonarnej. Znaczne utrudnienie wzrostu bakterii widać od godziny 12 w hodowli z R_{zdługi}(tRNA) i wynosi ono około 50% w stosunku do gęstości optycznej KW. W tym przypadku, wypłaszczenie pojawia się, ale jej przejście z fazy wzrostu logarytmicznego jest bardziej płaskie niż w przypadku krzywych wzrostu R_{zkrótki} i R_{zkrótki}(tRNA). W hodowli z R_{zkrótki} można zaobserwować podobny spadek wzrostu, jak w grupie bez IPTG. Powyższe wyniki świadczą o aktywności R_{zdługi} i R_{zdługi}(tRNA) w komórkach bakterii.



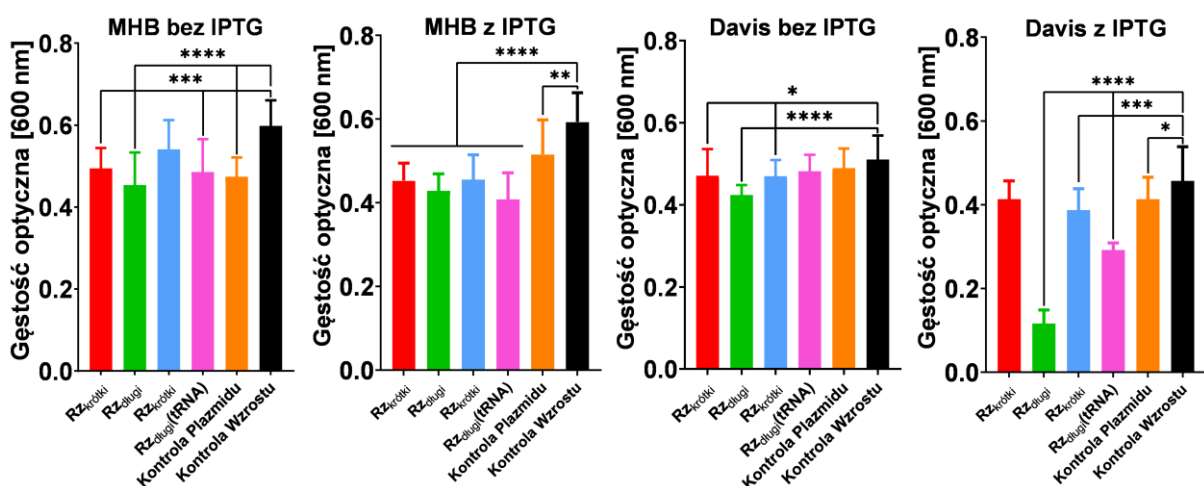
Rysunek 55. Aktywność rybozymów *in vivo* celujących w mRNA_{acpP}. Bakterie hodowano w pożywce Davisa pod kontrolą IPTG przez 24 godziny. IPTG dodano na początku eksperymentów. Pokazano średnie wartości, n = 6-18, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice we wzroście bakterii zawierających plazmid w porównaniu z Kontrolą Wzrostu są: istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, * P < 0,05), reszta różnic nie jest istotna.

4.3.13 Aktywność rybozymu w pożywce MHB i Davisa – ostatnie godziny

Wyniki kinetyki pokazują, że zarówno RZ_{długi} jak i RZ_{długi}(tRNA) mają wpływ na czasowe hamowanie wzrostu bakterii w zależności od zastosowanej pożywki.

Różnice wartości gęstości optycznej po 24 godzinach hodowli przedstawiono na Rysunku 56 i w Tabeli 8. Najniższą gęstość optyczną bakterii posiadających rybozimy zaobserwowano dla bakterii zawierających RZ_{długi} i RZ_{długi}(tRNA) w pożywce Davisa oraz hodowanych z induktorem IPTG.

W obydwu podłożach zaobserwowano różnicę w gęstości optycznej dla RZ_{długi} i RZ_{długi}(tRNA) po dodaniu IPTG, lecz jest ona wyższa w przypadku eksperymentów przeprowadzonych w pożywce Davisa. Jednak w ostatniej godzinie hodowli nie jest już obserwowana w pożywce MHB. Niższa wartość gęstości optycznej dla KP i hodowli z RZ w stosunku do KW jest prawdopodobnie wynikiem obciążenia komórek bakterii obecnością plazmidu. Najwyższy wzrost KW w porównaniu do reszty hodowli oraz tendencja ich wzrostu są zgodne z oczekiwaniami.



Rysunek 56. Porównanie cięcia *in vivo* mRNA_{acpP} w szczepie *E. coli* BL21(DE3) zawierającym plazmidy kodujące różne rybozomy po 24 godzinach hodowli. Pokazano średnie wartości, n = 6-18, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice w OD pomiędzy bakteriami zawierającymi plazmid i kontrolą wzrostu są: statystycznie istotne (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), pozostałe nieistotne.

Tabela 8. Procent wzrostu bakterii z różnymi rybozomami lub bez nich w porównaniu z kontrolą wzrostu, po 24 godzinach hodowli. Jako 100% odniesienia przyjęto OD GC.

Warunki hodowli	MHB bez IPTG [%]	MHB z IPTG [%]	Davis bez IPTG [%]	Davis z IPTG [%]
Hodowla				
Kontrola Wzrostu (KW)	100	100	100	100
Kontrola Plazmidu (KP)	79	87	96	90
RZkrótki	83	76	92	90
RZdługi	76	72	83	25
RZkrótki(tRNA)	90	77	92	85
RZdługi(tRNA)	81	69	94	64

Prowadzenie hodowli w szklanych probówkach, w krótszym czasie, pozwoliło na łatwiejsze i bardziej bezpośrednie dostosowanie momentu dodania IPTG, a przez to dokładniejsze obserwacje zmian po jego pojawieniu się w pożywce. Niemniej jednak, to 24-godzinna kinetyka pozwoliła na szersze zaobserwowanie podobieństw i różnic we wzroście poszczególnych bakterii, a przede wszystkim sprawdzenie efektywności rybozomów w cięciu mRNA_{acpP} po dobie hodowli.

4.3.14 Niekontrolowana ekspresja RZdługi w pożywce MHB bez IPTG

Analiza wykresów hodowli bakterii w trzech pożywkach bez dodatku IPTG wykazała, że wyłącznie pożywka MHB nie spełnia założenia braku obserwacji aktywności rybozomów w grupie bez induktora. Co prawda, w pożywce LB rybozomy nie mają żadnej aktywności, nawet z dodatkiem induktora, jednak z eksperymentów w pożywce Davisa i MHB z IPTG wiemy, że RZdługi i RZdługi(tRNA) wykazują działanie przeciwbakteryjne przez pewien czas. Takie zachowanie rybozomu RZdługi w pożywce MHB bez dodatku IPTG musi być spowodowane wyciekami promotora (ang. *plasmid promoter leakage*) i jego aktywacją, a w konsekwencji niekontrolowaną ekspresją rybozomu. Skład pożywki ma wpływ na ekspresję genów będących pod kontrolą promotora *lac* w szczepie *E. coli* BL21(DE3). Dowiedziono, że ekstrakt drożdżowy oraz składniki pochodzenia zwierzęcego (m. in. pepton żelatynowy, pepton kazeinowy) nie powodują wycieku promotora, zaś te pochodzenia roślinnego (pepton sojowy, ekstrakt słodowy) mogą powodować duże, niekontrolowane ekspresje genów (151). Jest to spowodowane wysokim

podobieństwem cząsteczek sacharydów roślinnych do IPTG i allolaktazy, cząsteczek najczęściej używanych do kontrolowanej ekspresji genów związanej z polimerazą T7 RNA. W skład mączki sojowej wchodzi kilka sacharydów: glukoza, galaktoza, sacharoza, rafinoza i stachioza, które zostały oddzielnie sprawdzone pod kątem indukcji operonu *lac*. W badaniach wykazano, że galaktoza, rafinoza i stachioza spowodowały ekspresję genów, czego nie zaobserwowano w przypadku glukozy i sacharozy. Składniki pożywek wykorzystanych w badaniach kinetycznych rybozymów przedstawiono w Tabeli 9 (151).

Tabela 9. Skład pożywek użytych w eksperymentach badania aktywności rybozymów *in vivo*.

Pożywka	Składniki pożywki
LB	trypton, ekstrakt drożdżowy, chlorek sodu (NaCl)
MHB	ekstrakt wołowy, kwaśny pepton kazeinowy, skrobia
Davis	fosforan dipotasu (K_2HPO_4), fosforan monopotasu (KH_2PO_4), siarczan magnezu ($MgSO_4$), siarczan amonu ($(NH_4)_2SO_4$), cytrynian sodu, glukoza

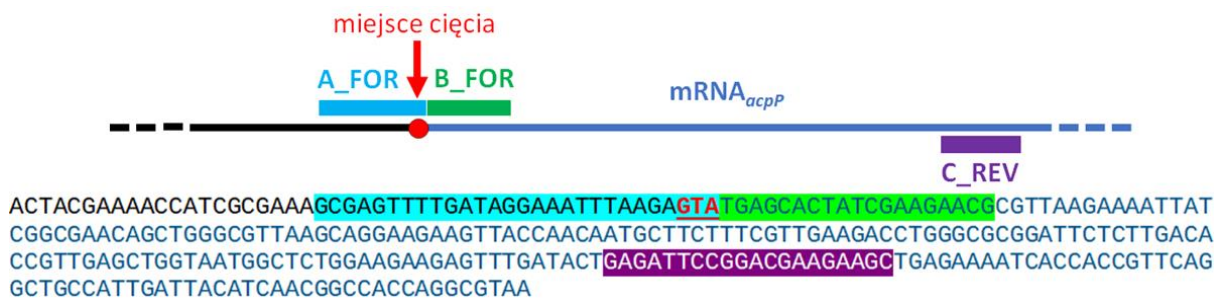
Jedyną pożywką posiadającą w składzie sacharyd jest MHB. Skrobia w niej zawarta ($1.5 \text{ mg/ml} = 7.14\%$) ma na celu wchłanianie toksyn uwalnianych przez bakterie, co uniemożliwia zakłócanie działania badanych substancji przeciwbakteryjnych przez te toksyny. Mimo, że skrobia nie została bezpośrednio zbadana w przytoczonej publikacji, porównując jej strukturę do indukujących sacharydów sojowych można wywnioskować, że jest ona powodem niekontrolowanej ekspresji genów w grupie hodowli bez IPTG (151). Jej ilość w pożywce MHB była wystarczająca, by zaobserwować aktywność $Rz_{długi}$ bez dodatku IPTG (czas pomiędzy 2-5 godzin hodowli), ale zbyt niska, by utrudnienie wzrostu bakterii utrzymało się długotrwale (24 godzina). Z kolei obecność glukozy w pożywce Davisa nie spowodowała ekspresji genów, co zgadza się z wynikami podanymi w publikacji (151).

4.3.15 Weryfikacja produktów cięcia mRNA_{acpP} *in vivo*

Biorąc pod uwagę wyniki z kinetyki *in vivo* do weryfikacji cięcia mRNA użyto hodowli z $Rz_{długi}$, $Rz_{długi}(tRNA)$ oraz KW. Trzy zaprojektowane startery (Tabela 10) miały umożliwić sprawdzenie i ewentualny poziom cięcia mRNA_{acpP} przez rybozymy (Rysunek 57). W przypadku cięcia substratu oczekiwano obecności produktu pary B_FOR–C_REV (BC) oraz niskiego poziomu produktu pary A_FOR–C_REV (AC) dla hodowli z $Rz_{długi}$ i $Rz_{długi}(tRNA)$. W przypadku KW spodziewano się produktów od obydwu par starterów. Jako kontrolę wykorzystano mRNA *ihfB* genu referencyjnego *E. coli* i przetestowane w innych badaniach pary starterów (*ihfB*_FOR i *ihfB*_REV). W przypadku tego celu mRNA, produkt powinien być otrzymany ze wszystkich trzech hodowli. Jego poziom powinien być porównywalny z poziomem produktu otrzymanego z pary starterów BC.

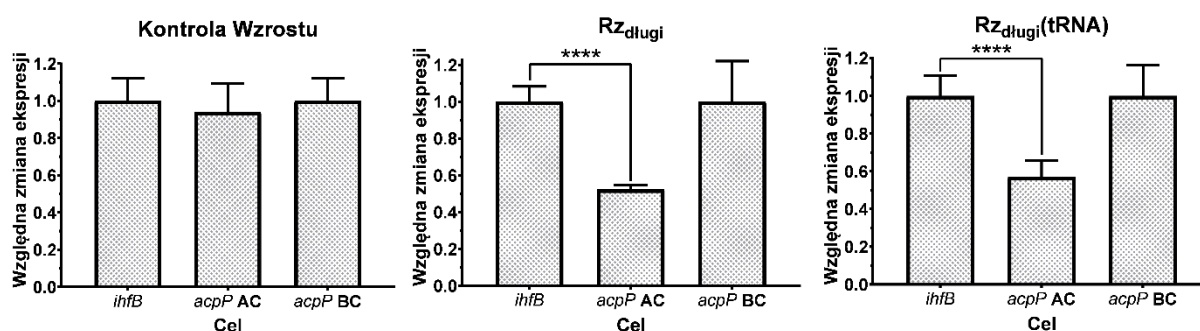
Tabela 10. Sekwencje starterów wykorzystanych do eksperymentów RT-qPCR.

Nazwa startera	Gen celowany	Sekwencja startera	Długość startera [nt]	Źródło startera
A_FOR	<i>acpP</i>	GCGAGTTTTGATAGGAAATTTAAGAGTA	28	Ten projekt
B_FOR	<i>acpP</i>	TGAGCACTATCGAAGAACG	19	Ten projekt
C_REV	<i>acpP</i>	GCTTCTTCGTCCGGAATCTC	20	Ten projekt
<i>ihfB</i> _FOR	<i>ihfB</i>	GCGGTTTCGGCAGTTTCT	18	(258)
<i>ihfB</i> _REV	<i>ihfB</i>	CGCAGTTCTTTACCAGGTTT	20	(258)



Rysunek 57. Schemat i fragment genów pokazujące sekwencje, do których zaprojektowano startery do weryfikacji cięcia mRNA_{acpP} na etapie amplifikacji PCR w RT-qPCR. Pierwszy starter forward - A_FOR - obejmuje sekwencję cięcia, a drugi starter forward - B_FOR - zaczyna się bezpośrednio po miejscu cięcia. Starter reverse - C_REV – jest komplementarny do sekwencji zlokalizowanej 159 nt od miejsca cięcia.

Rysunek 58 przedstawia ostateczne wyniki RT-qPCR. Zgodnie z oczekiwaniami, produkty referencyjnego genu *ihfB* (258) oraz *acpP*, otrzymanego z pary starterów BC, wykryto na tym samym poziomie (Tabela 11). Produkty PCR z mRNA_{acpP} hodowli KW wykryte przez obydwie pary starterów (AC i BC) były na zbliżonym poziomie. Wyniki ekspresji genów dla bakterii zawierających rybozym pokazują wyraźną różnicę pomiędzy poziomem produktów par AC i BC. Poziom produktów pary AC wynosił 52% dla Rz_{dlugi} i 57% dla Rz_{dlugi}(tRNA) względem poziomu produktów BC i produktu kontrolnego *ihfB*. Wyniki RT-qPCR potwierdzają działanie rybozymów Rz_{dlugi} i Rz_{dlugi}(tRNA) *in vivo* i cięcie mRNA_{acpP}. Jest to proces aktywny w czasie co oznacza, że bakterie namnażają się i mRNA_{acpP} jest stopniowo cięte przez rybozomy. Należy wziąć pod uwagę, że RNA wyizolowano w momencie, gdy wzrost bakterii znacząco przewyższył działanie rybozymu. Wcześniejsza izolacja RNA bakteryjnego, np. z hodowli Rz_{dlugi} po 8 czy 10 godzinach mogłaby skutkować brakiem jakiegokolwiek produktu ze względu na zahamowany wzrostu bakterii w tym czasie. Tymczasem, zaobserwowano oczekiwany efekt działania zaprojektowanego rybozymu *hammerhead* w wersjach Rz_{dlugi} i Rz_{dlugi}(tRNA) na mRNA_{acpP} w komórkach bakterii.



Rysunek 58. Względna zmiana ekspresji genu *acpP* po cięciu mRNA_{acpP} *in vivo* przez Rz_{dlugi} i Rz_{dlugi}(tRNA) w porównaniu z genem referencyjnym *ihfB*. Pokazane są średnie wartości, n = 2-8, ze słupkami błędów obliczonymi jako błąd standardowy średniej. Różnice ekspresji produktów *acpP* AC w porównaniu z produktami *ihfB* w hodowlach Rz_{dlugi} i Rz_{dlugi}(tRNA) są wysoce istotne statystycznie (**** P < 0,0001).

Tabela 11. Procent względnej zmiany ekspresji genu *acpP* po cięciu mRNA_{*acpP*} *in vivo* w porównaniu z KW i genem referencyjnym *ihfB*.

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Docelowa para starterów	Procentowość [%] mRNA po RT-qPCR
Kontrola Wzrostu bez Rz (KW)	<i>ihfB</i>	100
	<i>acpP</i> AC	94
	<i>acpP</i> BC	100
RZdtugi	<i>ihfB</i>	100
	<i>acpP</i> AC	52
	<i>acpP</i> BC	100
RZdtugi(tRNA)	<i>ihfB</i>	100
	<i>acpP</i> AC	57
	<i>acpP</i> BC	100

4.3.16 Porównanie sekwencji substratu szczepu *E. coli* BL21(DE3) i szczepów patogennych *E. coli*

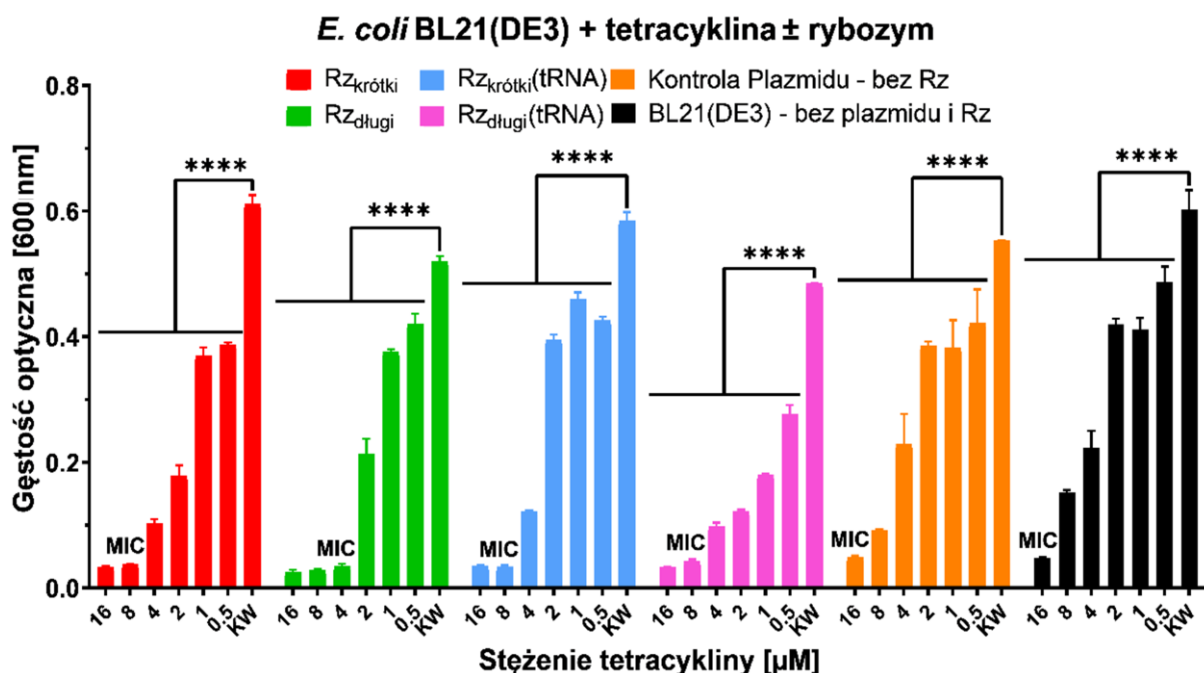
Dopasowano sekwencję DNA otaczającą kodon START genu *acpP* w obrębie gatunku *E. coli*. Porównano sekwencję DNA wokół kodonu start *acpP* dwunastu szczepów patogennych o różnych patotypach względem sekwencji odniesienia z testowanego niepatogennego szczepu *E. coli* BL21(DE3). Dopasowanie sekwencji wykazało, że kodon START i jego otoczenie są identyczne w każdym szczepie. (Tabela 12). Świadczy to o możliwości wykorzystania badanej sekwencji mRNA_{*acpP*} w przyszłości, również w szczepach chorobotwórczych.

Tabela 12. Porównanie sekwencji DNA substratu wokół kodonu start miejsca cięcia *acpP* ATG w wybranych szczepach patogennych *E. coli* w porównaniu z referencyjnym szczepem niepatogennym *E. coli* BL21(DE3).

Grupa patotypu	Szczep <i>Escherichia coli</i>	ID sekwencji : zakres	Procent dopasowania DNA
niepatogenny	BL21(DE3) (137)	NC_012971.2:1154164-1154197	GATAGGAAATTTAAGAGT <u>ATG</u> GAGCACTATCGAAG
EAEC	O44:H18 042 (152)	NZ_CP042934.2:1178363-1178396	100%
EHEC	O157:H7 EDL933 (153)	NZ_CP008957.1:1598427-1598460	100%
EHEC	O157:H7 Sakai (154)	NC_002695.2:1510833-1510866	100%
EHEC	O145:H28 RM13514 (155)	NZ_CP006027.1:1377026-1377059	100%
EPEC	O127:H6 E2348/69 (156)	NC_011601.1:1235926-1235959	100%
EPEC	O55:H7 RM12579 (157)	NC_017656.1:1402712-1402745	100%
ETEC	O139:H28 E24377A (158)	NC_009801.1:1229028-1229061	100%
ETEC	O78:H11:K80 H10407 (159)	NC_017633.1:1257657-1257690	100%
ETEC	UMNK88 (160)	NC_017641.1:1332353-1332386	100%
UPEC	O6:K2:H1 CFT073 (161)	NZ_CP051263.1:1303345-1303378	100%
UPEC	O18:K1:H7 UTI89 (162)	NZ_CP064825.1:1196561-1196594	100%
UPEC-ESBL	O25b:K100:H4-ST131 EC958 (163)	NZ_HG941718.1:1211962-1211995	100%

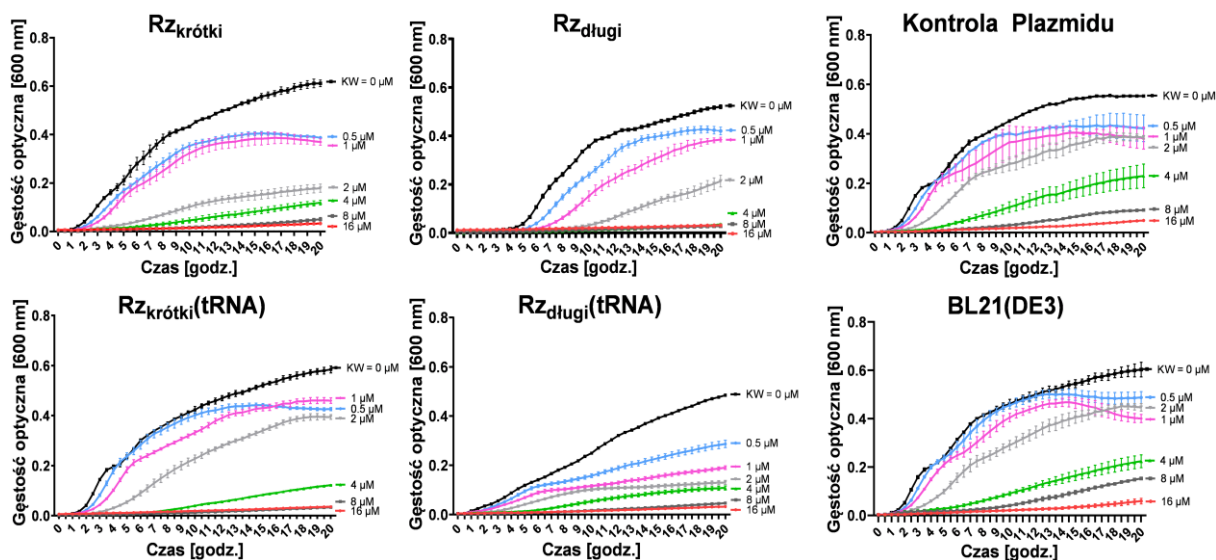
4.3.17 Aktywność rybozymów w obecności tetracykliny

W celu sprawdzenia czy działanie Rz może wspomóc działanie antybiotyku, przeprowadzono eksperyment kinetyki z dodatkiem tetracykliny. Jej minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost *E. coli* BL21(DE3) jest dość wysokie i wynosi 16 μM (86). Doświadczenie przeprowadzono w pożywce MHB, ponieważ jest to podłoże referencyjne do badania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe. Bakterie z czterema wariantami Rz, KP oraz KW inkubowano przez 20 godzin w różnych stężeniach tetracykliny. Gęstości optyczne po 20 godzinach hodowli wykazały, że obecność rybozymu przyczynia się do obniżenia wartości MIC tetracykliny. Zamiast 16 μM wynosi on 8 μM dla $\text{Rz}_{\text{krótki}}$, $\text{Rz}_{\text{krótki}}(\text{tRNA})$ i $\text{Rz}_{\text{długi}}(\text{tRNA})$ oraz 4 μM dla $\text{Rz}_{\text{długi}}$ (Rysunek 59). To doświadczenie pokazało, że wszystkie bakterie zawierające Rz były bardziej wrażliwe na tetracyklinę.



Rysunek 59. Gęstość optyczna mierzona dla bakterii z lub bez wariantów Rz (kodowanych na plazmidach) hodowanych w MHB i inkubowanych z tetracykliną. Pokazane są średnie wartości, $n = 2-5$, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice w gęstości optycznej w odniesieniu do kontroli wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$).

Kinetykę każdej hodowli bakteryjnej inkubowanej z tetracykliną pokazano na rysunku 60. Największe podobieństwo do krzywej wzrostu KW *E. coli* BL21(DE3) wykazują krzywe KP oraz $\text{Rz}_{\text{krótki}}(\text{tRNA})$. Najmniejsze podobieństwo widać w przypadku bakterii z $\text{Rz}_{\text{długi}}(\text{tRNA})$. Najdłuższe opóźnienia wzrostu bakterii, do godziny 4,5 dla KW i do godziny 9,5 przy 2 μM tetracykliny obserwuje się w dla hodowli z $\text{Rz}_{\text{długi}}$. W porównaniu do 24-godzinnych eksperymentów kinetycznych bez tetracykliny (Rysunek 54), powtarzalną obserwacją jest spłaszczenie krzywej wzrostu bakterii zawierających $\text{Rz}_{\text{długi}}(\text{tRNA})$ w porównaniu z innymi hodowlami. Spłaszczenie logarytmicznej fazy wzrostu obserwowane od samego początku hodowli zwiększające się wraz ze wzrostem stężenia tetracykliny wskazuje, że $\text{Rz}_{\text{długi}}(\text{tRNA})$ znacznie utrudnia wzrost bakterii w porównaniu do bakterii zawierających inne rybozymy. Ukrycie $\text{Rz}_{\text{długi}}$ w strukturze tRNA nie powoduje znacznego opóźnienia w rozwoju bakterii, jak w przypadku $\text{Rz}_{\text{długi}}$ bez tRNA, jednak wpływa na ich słabszy wzrost w porównaniu do reszty hodowli.



Rysunek 60. Kinetyka cięcia mRNA_{acpP} w bakterii hodowanych w MHB inkubowanych z tetracykliną pod kontrolą IPTG przez 20 godzin. IPTG dodano na początku eksperymentów. Pokazane są średnie wartości, n = 2-5, ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice w OD pomiędzy bakteriami zawierającymi plazmid i kontrolą wzrostu są: istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, ** P < 0,01, * P < 0,05), pozostałe różnice nie są istotne.

4.4 Dyskusja

W pracy zaproponowano mRNA trzech kluczowych genów jako substratów do cięcia *in vitro* przez zaprojektowany rybozym *hammerhead*. Rdzeń katalityczny rybozymu jest taki sam we wszystkich wersjach, jednak jego aktywność różni się w zależności od substratu i długości ramion rybozymu, które tworzą kompleks z substratem. Otrzymane wyniki wskazują, że w celu uzyskania efektywnego cięcia ważna jest nie tylko sekwencja rdzenia katalitycznego (87,88) oraz obecność dopuszczalnej trójki nukleotydów w miejscu cięcia (117,118), ale również ich wzajemne dopasowanie oraz długość powstałego kompleksu. W niniejszej rozprawie wykazano wysoką efektywność cięcia trójki GUA w substracie mRNA_{acpP} przez rybozym z krótkimi ramionami. Wyraźne produkty cięcia GUA dostrzeżono także w substracie mRNA_{frt} również przez rybozym z krótkimi ramionami, jednak po znacznie dłuższym czasie i bez większych zmian intensywności substratu. Co prawda, po blisko dobie inkubacji fragmentu mRNA_{murA} posiadającego trójkę AUA z rybozymem krótkim zauważalne są prążki sugerujące otrzymanie produktów cięcia, jednak nie można tu mówić o jakiegokolwiek efektywności katalitycznej.

Carbonell i wsp. (164) pokazał, że przy stężeniu 1-4 mM Mg²⁺ rybozym *hammerhead* utajonego wiroida bakłazana wykazał nieznacznie większą aktywność w cięciu mutanta z trójką GUA niż w cięciu oryginalnej trójki AUA. Obydwie trójki były efektywniej cięte niż mutanty GUC i AUC. W przypadku reakcji prowadzonej w niższym stężeniu Mg²⁺, tj. 10 i 50 μM, rybozomy skierowane przeciwko GUA i AUA miały niższą aktywność katalityczną. W obu stężeniach trójka GUA okazała się lepszym celem niż AUA (164). W innej pracy modulowano ekspresję genu *apoB*, którego nadprodukcja apolipoproteiny B jest związana z przedwczesną chorobą wieńcową. Celowano w trójki: AUA oraz GUA oddalone od siebie o 14 nukleotydów. Testy *in vitro* wykazały, że sekwencja AUA była efektywniej cięta po 1 i 2 godzinach inkubacji, odpowiednio o 17 i 11%. Dodatkowo, wprowadzono jedną mutację w rdzeniu katalitycznym, która spowodowała całkowity brak cięcia substratu. Z kolei ekspresja rybozymów anty-AUA i anty-GUA w ludzkich liniach komórkowych była znacznie efektywniejsza w drugim przypadku i spowodowała spadek poziomu mRNA_{apoB} o około 80% (165). W innych badaniach podjęto próby zwiększenia efektywności cięcia trójki AUA poprzez losowe wprowadzanie mutacji w rdzeniu katalitycznym rybozymu. Spośród 15 utworzonych mutantów tylko dwa z nich poprawiły aktywność rybozymu o

kilkanaście procent (166). Otrzymane wyniki wraz z danymi literaturowymi pokazują, że rybozym o tym samym rdzeniu katalitycznym może wykazywać zróżnicowaną aktywność. Wpływa na nią nie tylko trójka nukleotydów poprzedzająca miejsce cięcia, ale z pewnością również sekwencja ją okalająca tworząca kompleks z rybozymem. Poprzez wprowadzenie mutacji w odpowiednich miejscach rybozemu, w niektórych przypadkach także w rdzeniu katalitycznym, może dojść do zwiększenia efektywności cięcia. Co więcej, rybozym aktywniejszy w eksperymentach *in vitro*, nie musi działać efektywniej w warunkach *in vivo*.

Zbadane w projekcie doktorskim efekty cięcia fragmentu substratu mRNA_{acpP} *in vitro* wykazały dużo lepszą aktywność w przypadku Rz_{krótki}. Niemniej jednak, to właśnie ekspresja Rz_{długi} w eksperymentach *in vivo* spowodowała największe zahamowanie wzrostu bakterii w pożywce Davisa (Rysunek 55). Można to przypisać szybszej degradacji Rz_{krótki} przez rybonukleazy, uniemożliwiając mu dotarcie do substratu w całości. Innym możliwym wyjaśnieniem może być niewystarczająco silne wiązanie docelowego mRNA przez Rz_{krótki} wewnątrz komórki. Ukrycie rybozemu w strukturze tRNA nie poprawia wydajności cięcia, ale nadal pozwala na zauważalne zahamowanie wzrostu bakterii w przypadku Rz_{długi}(tRNA). Prawdopodobnie rybozymowi trudniej jest dotrzeć do celu, gdy jest osadzony w strukturze tRNA. Z drugiej strony, struktura tRNA może chronić rybozym przed degradacją. Nie oceniano jednak stabilności rybozymów w komórkach bakteryjnych. Należy wziąć pod uwagę, że zaobserwowane hamowanie wzrostu bakterii można potencjalnie przypisać kilku czynnikom: a) przecięciu mRNA przez rybozym (co zostało potwierdzone w eksperymentach RT-qPCR); b) sterycznemu blokowaniu substratu mRNA przez rybozym, które nawet bez cięcia może uniemożliwić translację; c) rozszczepieniu dupletu mRNA z rybozymem przez RNazę H (74), która działa katalitycznie zamiast rybozemu oraz d) słabszy wzrost bakterii ze względu na obciążenie komórek obecnością wysokokopijnego plazmidu, co może prowadzić do zahamowania wzrostu niezależnie od zakłócenia biosyntezy białka ACP. Te cztery efekty mogą również współistnieć, a każdy z nich przyczynia się do obserwowanego hamowania wzrostu bakterii. Istotny jest również odpowiedni dobór stężenia induktora IPTG. Nie jest on metabolizowany przez bakterie, więc jego stężenie w komórce pozostaje stałe (167). Jednak zbyt duże stężenie tego induktora i idąca za tym większa ekspresja pożądanych genów z plazmidu może stanowić dodatkowe obciążenie metaboliczne dla komórki bakterii (138,168,169).

Opisane w literaturze substraty stanowiły część bakteryjnego mRNA lub były wytwarzane *in vivo* z plazmidu wraz z dedykowanym im rybozymem. Substraty obejmowały mRNA genów niezbędnych bakteriom do życia (122), genów niekoniecznych bakteriom do przetrwania (120,121) oraz onkogenów (123). W zacytowanych publikacjach cięcie mRNA zostało przeprowadzone przede wszystkim za pomocą rybozymów, w szczególności przy użyciu rybozimu *hammerhead*. Niemniej jednak, godne uwagi wyniki otrzymano dla cięcia mRNA protoonkogenu przez rybozym RNazę P (123), jak również mRNA kluczowego genu bakterii przez enzym DNA (122). W cytowanych publikacjach wykazano katalityczną aktywność enzymów zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ekspresja rybozymów może być zapoczątkowana przez dodanie IPTG (121,123) lub tetracykliny (122). Ciekawą obserwacją jest trzykrotnie szybsza, w obecności spiramycyny, redukcja mRNA protoonkogenu zakodowanego na plazmidzie z ekspresją rybozymów indukowaną przez IPTG w komórkach *E. coli* (123). Przecięcie mRNA genu *lexA* związanego z funkcją naprawy bakteryjnego DNA spowodowało zwiększoną wrażliwość bakterii na światło UV (41). W teście β -galaktozydazy aktywny rybozym zmniejszył ekspresję genu *lacZ'* o ponad 90%. Efekt ten zaobserwowano w fenotypie kolonii bakteryjnych. W obecności IPTG i X-gal w pożywce zmieniły one barwę z niebieskiej na bezbarwną (zbadano 3 losowe kolonie z płytki) w porównaniu z hodowlą zawierającą nieaktywny rybozym (121). W przypadku substratu mRNA genu *ftsZ*, odpowiedzialnego za podział komórek i żywotność bakterii, enzym DNA nie tylko efektywnie zatrzymał jego ekspresję, ale także skutecznie zahamował proliferację komórek bakteryjnych w ciągu 3 godzin od rozpoczęcia ekspresji rybozimu (122).

Obecność rybozymów w komórkach bakterii zwiększa ich wrażliwość na tetracyklinę, co wskazuje na efekt addytywny lub nawet synergistyczny enzymu RNA i antybiotyku. Badania nad synergią związków przeciwbakteryjnych rozpoczęto już na początku lat pięćdziesiątych XX wieku (170). Badano połączenia tradycyjnych antybiotyków m.in. z innymi konwencjonalnymi antybiotykami (170–172),

peptydowymi kwasami nukleinowymi (PNA) (141,173) i nukleinowymi (PNA) (141,173) i peptydami (174,175). Niektóre z synergii zostały dopuszczone do użytku klinicznego, ale wiele antybiotyków stosuje się w terapiach skojarzonych bez zatwierdzenia (1). Mimo ówczesnego braku wiarygodnych danych klinicznych (172). Co ciekawe, synergia niektórych terapeutów przeciwbakteryjnych spowodowała zależne od stężenia hamowanie powstawania oraz rozrywanie struktur biofilmów tworzonych przez klinicznie izolowane szczepy bakterii (171). PNA blokujący sekwencję *acpP* wykazał synergizm z polimiksyną B i trimetoprimem w szczepach *E. coli* zmniejszając ich minimalne stężenia hamujące wzrost bakterii: 4-8 razy w przypadku PNA i 4-13 razy w przypadku antybiotyków (141). Inne badanie wykazało wysoką synergizm PNA_{anty-thyA} (gen *thyA* koduje enzym biorący udział w metabolizmie kwasu foliowego) z trimetoprimem u *E. coli* przy 4-krotnie niższym stężeniu hamującym dla PNA i 16-krotnie niższym dla antybiotyku (173). Z kolei synergistyczny efekt bakteriobójczy z peptydami zaobserwowano u *E. coli* przy obniżonych stężeniach: 2-8 razy w przypadku antybiotyku i 4-32 razy w przypadku peptydu przeciwbakteryjnego (174,175). Oprócz efektu synergistycznego wykazano także addytywne działanie przeciwbakteryjne różnych związków. Wyniki te świadczą o dużej wartości i sensie poszukiwania nowych kombinacji różnorodnych środków przeciw drobnoustrojom, choć nadal nie ma wśród nich rybozymów. Tym bardziej interesująca jest obserwacja, że ekspresja i aktywność Rz czynią bakterie bardziej podatnymi na tetracyklinę.

W pracy doktorskiej przetestowano różne podłoża do hodowli bakterii pod kątem aktywności rybozymu. Należy zauważyć, że w tlenowych warunkach laboratoryjnych, w podłożach bogatych w składniki odżywcze, komórka *E. coli* dzieli się mniej więcej co 20 minut (176), podczas gdy w beztlenowym środowisku jelit człowieka czas podwojenia wydłuża się do około 40 godzin (177). W związku z tym, nawet zastosowanie pożywek minimalnych w hodowli w dalszym ciągu bardziej sprzyja rozwojowi bakterii w porównaniu z warunkami panującymi w organizmie człowieka.

W oparciu o przeprowadzone badania i przytoczoną literaturę można stwierdzić, że hamowanie wzrostu bakterii poprzez cięcie mRNA genów kluczowych za pomocą rybozymów jest wykonalne, lecz wymaga dalszej pracy. Wiodącymi kwestiami w przyszłych testach jest wybór odpowiedniego substratu i miejsca cięcia oraz rybozymu zdolnego nie tylko do skutecznego przecięcia mRNA, ale również do uniemożliwienia regeneracji bakterii. Kolejne badania powinny skupiać się również na znalezieniu takiego sposobu dostarczania rybozymów do komórek, aby nie polegać wyłącznie na plazmidach i specjalnych szczepach bakteryjnych dostarczających polimerazę T7 RNA. Mimo że plazmidy są bardzo przydatne w badaniach wstępnych i względnie proste do wprowadzenia do bakterii, to samo zaprojektowanie i przygotowanie kaset z sekwencją rybozymu, a następnie jego ekspresja i osiągnięcie efektywnej aktywności *in vivo* jest skomplikowane, a czasem nawet niemożliwe. Ogranicza to praktyczne zastosowanie enzymów katalitycznych w komórkach. Ponadto, w przypadku rybozymów duże znaczenie ma znalezienie metod ich ochrony przed degradacją nukleazami wewnątrzkomórkowymi. Niemniej jednak, rybozymy mają potencjał, aby wspomóc istniejące terapie poprzez zmniejszenie stężeń stosowanych antybiotyków i w konsekwencji ich niekorzystnych skutków ubocznych.

4.5 Podsumowanie

Zaprojektowano różne wersje rybozymu *hammerhead* skierowane przeciwko fragmentom mRNA_{*acpP*}, mRNA_{*murA*}, i mRNA_{*frr*}. Przy użyciu ITC potwierdzono tworzenie się *in vitro* silnych kompleksów substrat:rybozym. Za pomocą elektroforezy żelowej sprawdzono możliwość rozszczepienia substratów *in vitro*, a najefektywniejsze cięcie otrzymano dla fragmentu mRNA_{*acpP*}. Przygotowano różne warianty rybozymu anty-*acpP* włączając ich sekwencje do plazmidów, które wtransformowano do komórek *E. coli* BL21(DE3). Skorzystanie z kontrolowanej ekspresji rybozymów pozwoliło zaobserwować cięcie mRNA_{*acpP*}, czego skuteczność potwierdzono metodą RT-qPCR. Zaobserwowano, że bakterie posiadające rybozym były bardziej wrażliwe na tetracyklinę. Wykazano, że rybozymy mogą efektywnie hamować wzrost bakterii nie tylko jako pojedyncze związki, ale również w połączeniu z konwencjonalnymi antybiotykami.

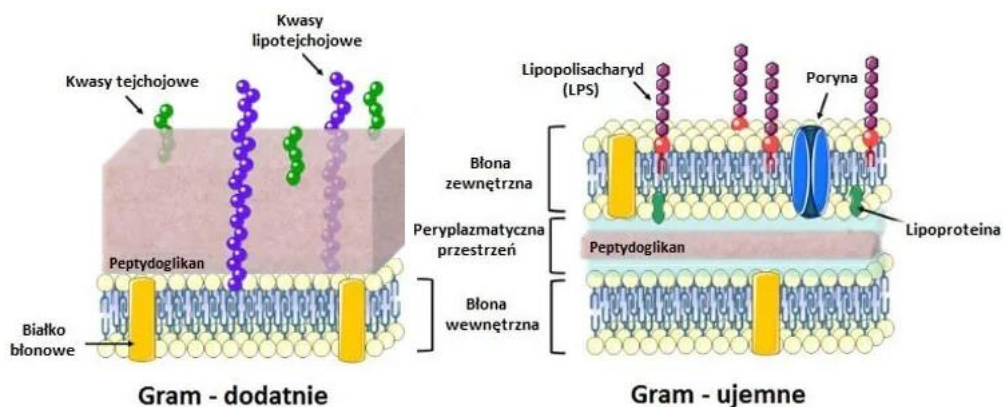
5 Przeciwbakteryjne działanie peptydów i peptydomimetyków

5.1 Wstęp

5.1.1 Budowa ściany komórkowej bakterii

Środowisko wewnętrzne bakterii otoczone jest wielowarstwową ścianą komórkową. Jej budowa jest różna dla bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (Rysunek 61). W obydwu przypadkach dostęp do cytoplazmy jest zamknięty przez wewnętrzną błonę cytoplazmatyczną, CM (ang. *Cytoplasmic Membrane*). Składa się ona z alifatycznej dwuwartwy lipidowej (fosfolipidów): hydrofilowej części fosforanowej i hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych, które mogą się od siebie różnić w zależności od szczepu bakterii. W CM znajdują się liczne białka powierzchniowe (peryferyjne) oraz transbłonowe (integralne). Następną warstwę u bakterii Gram-ujemnych stanowi przestrzeń peryplazmatyczna z pojedynczą lub kilkoma cienkimi warstwami peptydoglikanu (mureiny) (2-10 nm), nadającymi kształt komórce i zapewniającymi ochronę mechaniczną przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi oraz turgorem wewnątrzkomórkowym. Skład mureiny również może się różnić w zależności od szczepu bakterii. Przestrzeń peryplazmatyczna również zawiera białka, m. in. transportujące, ochronne oraz enzymy. Następnie, w ścianie komórkowej bakterii występuje błona zewnętrzna, OM (ang. *Outer Membrane*), w której również znajduje się wiele białek pełniących różne funkcje. W przeciwieństwie do CM na jej powierzchni znajdują się endotoksyny, czyli lipopolisacharydy (LPS), które nadają bakterii m. in. właściwości chorobotwórcze oraz chronią przed działaniem antybiotyków, szczególnie hydrofobowych. LPS są związkami amfipatycznymi, których łańcuchy polisacharydowe (antygeny O) stanowią najbardziej wysuniętą, zewnętrzną część łączącą się poprzez rdzeń z lipidem A zakotwiczonym w błonie. Łańcuchy wielocukrowe i rdzeń LPS, mogą mieć odmienną budowę w zależności od szczepu. Bakterie Gram-dodatnie nie posiadają przestrzeni peryplazmatycznej. Mają za to wiele usieciowanych warstw peptydoglikanu (30-100 nm) z przyłączonymi do niego silnie polarnymi, anionowymi kwasami tejchojowymi, TA (ang. *Teichoic Acids*) o dużej hydrofilowości oraz zakotwiczonymi w glikolipidach błony amfipatycznymi kwasami lipotejchojowymi, LTA (ang. *Lipoteichoic Acids*). Obydwa rodzaje kwasów mogą się różnić zależnie od gatunku bakterii. Mimo braku błony zewnętrznej, szczepy Gram-dodatnie zawierają białka zewnątrzkomórkowe posiadające dodatkowe elementy umożliwiające ich zakotwiczenie i utrzymanie się na zewnętrznej części peptydoglikanu lub kwasów tejchojowych (178–180).

Budowa błony bakteryjnej chroni bakterie przed szkodliwym działaniem niektórych związków przeciwdrobnoustrojowych. Z drugiej strony, może także wspomagać inne cząsteczki w ich interakcjach z błoną komórkową, co w konsekwencji wykazuje szkodliwe działanie przeciw mikroorganizmom. Przykładem może być apolipoforyna III, białko wiążące lipidy pochodzące z owada nocnego *Galleria mellonella* (181). Poza wiązaniem lipidów ma również właściwości wiązania węglowodorów, co ułatwia temu białku interakcje z bakteryjnym LPS i kwasem lipotejchojowym wykazując działanie przeciwbakteryjne. Pokazuje to, jak ważne jest poznanie i dostosowanie właściwości projektowanych związków przeciwbakteryjnych, w kwestii ich oddziaływania z błonami komórkowymi bakterii, w celu otrzymania skutecznych, aktywnych błonowo cząsteczek przeciwdrobnoustrojowym.



Rysunek 61. Porównanie budowy ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich.

Źródło: <https://naukawciemno.pl>

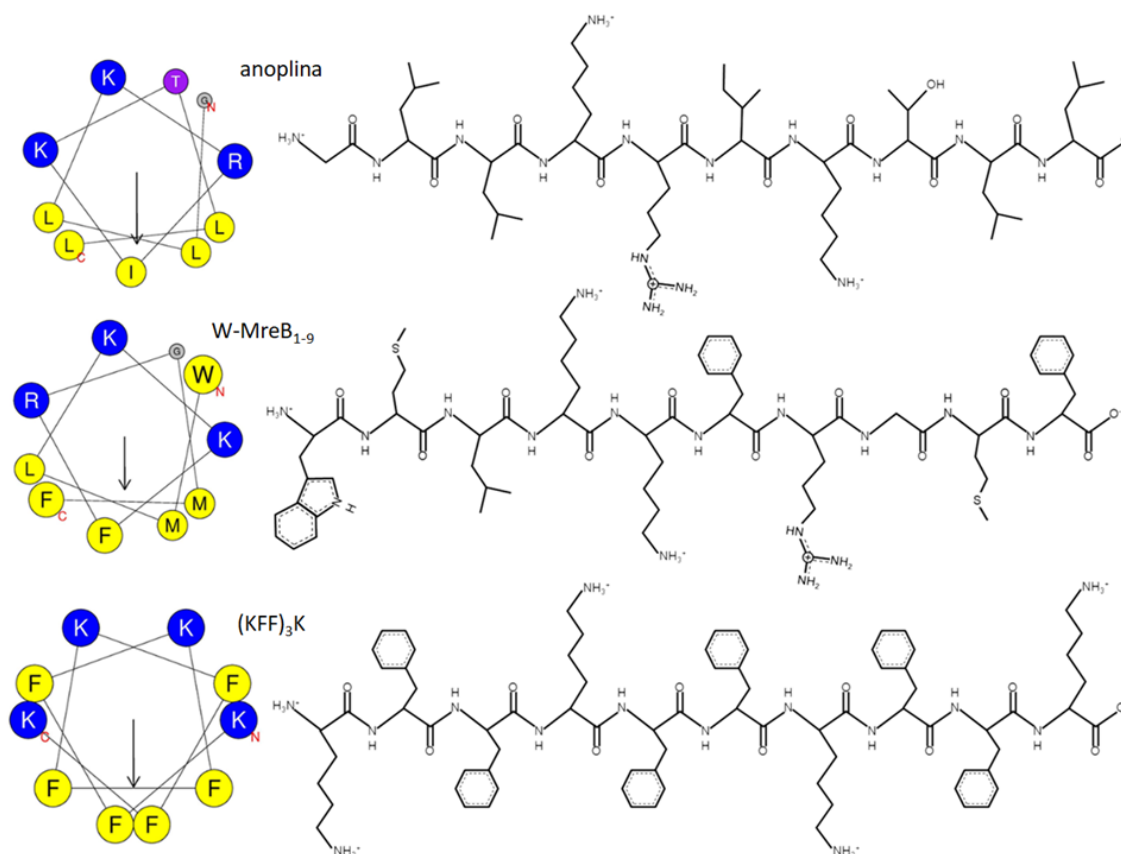
5.1.2 Peptydy przeciwdrobnoustrojowe i penetrujące komórkę

Peptydy są krótkimi łańcuchami składającymi się z od 2 do 50 aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi (182). Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, AMP (ang. *AntiMicrobial Peptides*) stanowią jeden z mechanizmów obrony zwierząt i roślin przed patogenami, i są produkowane m. in. przez ssaki, rośliny, mikroorganizmy, insekty. Mogą przyjmować różne struktury drugorzędowe, np. α -helisy czy β -kardki. Część AMP wykazuje aktywność już na poziomie błony komórkowej. Innymi peptydami działającymi na błony są peptydy penetrujące komórkę, CPP (ang. *Cell-Penetrating Peptides*). Co prawda mogą wykazywać toksyczność w kontakcie z błoną, jednak ich główną funkcją jest transport innych związków przez błonę do wnętrza komórki bakterii. Obydwa omówione wyżej typy peptydów mogą stanowić alternatywę dla antybiotyków, zwłaszcza w przypadku patogenów lekoopornych (183). Ich przedstawicielami są: anoplina i W-MreB₁₋₉ (AMP) oraz (KFF)₃K (CPP) (184) (Rysunek 62).

Anoplina (ang. *anoplin*) to peptyd, który został wyizolowany z jadu osy *Anoplius samariensis*. To najmniejszy naturalny liniowy AMP o strukturze α -helisy. Jest to peptyd amfipatyczny i składa się z 10 aminokwasów (GLLKRIKTLL). Wykazuje aktywność przeciw bakteriom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim. Ponadto, nie jest silnie hemolityczny (185–187).

W-MreB₁₋₉ jest 10-aminokwasowym (WMLKKFRGMF) helikalnym fragmentem białka MreB wiążącym błonę i odpowiadającym za utrzymanie kształtu komórki m.in. u szczepów *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Modyfikacja wnosząca dodatkowy aminokwas (tryptofan) na N-końcu peptydu znacznie zwiększyła jego aktywność zarówno przeciw bakteriom Gram-ujemnym, jak i Gram-dodatnim. Ten AMP destabilizuje błonę bakteryjną powodując jej przepuszczalność (188–190).

(KFF)₃K to syntetyczny, liniowy, składający się z 10 aminokwasów (KFFKFFKFFK) peptyd penetrujący komórkę (191). Jego głównym zadaniem jest transport związków do wnętrza komórki. Chociaż działa destabilizująco na błonę, nie wykazuje bezpośredniej aktywności przeciwbakteryjnej. Okazał się jednak bardzo skuteczny w synergii z antybiotykami (124,141,142,192).



Rysunek 62. Reprezentacja α -helis peptydów w konfiguracji kołowej oraz ich wzory szkieletowe. Konfiguracje kołowe zwizualizowano przy użyciu kalkulatora *HeliQuest*. Niebieskie koło – aminokwas hydrofilowy, żółte koło - aminokwas hydrofobowy, fioletowe/szare koło – aminokwas neutralny, czerwone litery N i C – N_{koniec} oraz C_{koniec} peptydu. Wzory szkieletowe otrzymano za pomocą programu *PepDraw*.

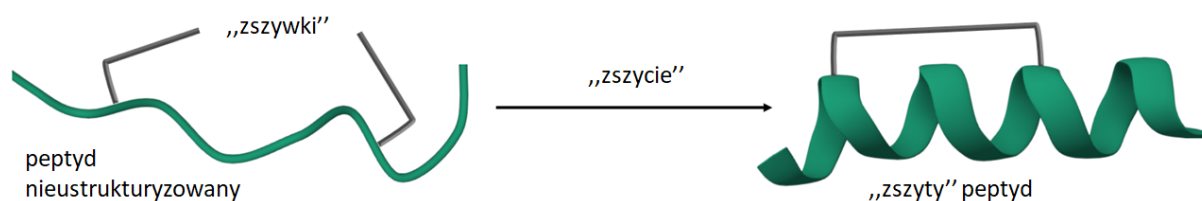
5.1.3 Zalety i wady peptydów w kontekście ich potencjalnego użycia w terapiach przeciwbakteryjnych

Peptydy to krótkie sekwencje aminokwasowe, dzięki czemu są łatwe w syntezie. Część z nich posiada właściwości amfipatyczne, co jest korzystne przy projektowaniu peptydów AMP. Mogą wykazywać działanie bakteriobójcze nawet bez wchodzenia do komórki oraz transportować inne związki do jej wnętrza. Są w stanie samoorganizować się w różne struktury, które mogą wspomagać ich działanie. Wykazują zdolność transportu przez błonę cząsteczek, które same nie mogą przedostać się do wnętrza bakterii. Z drugiej strony, peptydy są niestabilne, gdyż degradują je enzymy proteolityczne i tylko w określonej konformacji mogą wykazywać aktywność przeciwbakteryjną. Mają krótki okres półtrwania i ulegają szybkiej degradacji w komórce. Mogą być odczytywane przez organizm pacjenta jako nieznaną, a więc toksyczna cząsteczka i stymulować układ odpornościowy do jej zniszczenia zanim spełni swoją funkcję. Niektóre peptydy wykazują toksyczność również względem komórek eukariotycznych już na poziomie badań *in vitro*. Wykształcenie przez bakterie oporności na dany peptyd może uniemożliwić jego dalsze stosowanie. Ponadto, istnieje ograniczona ilość AMP możliwa do izolacji ze źródeł naturalnych, a synteza na większą skalę może być kosztowna (193,194).

5.1.4 „Zszywanie” peptydów

Peptydy często osiągają aktywność przeciwbakteryjną po uzyskaniu odpowiedniej struktury, którą przyjmują dopiero w kontakcie z błoną. Prowadzone są liczne badania zależności struktura-aktywność peptydów w celu znalezienia właściwości strukturalnych odpowiadających za ich efektywne działanie biologiczne. Przykładem może być pochodna protegryny-1, kationowego, amfipatycznego AMP o strukturze β -kartki (195). Jej skrócony analog również wykazywał działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz niską aktywność hemolityczną.

W niniejszej rozprawie, przedstawiono kolejny sposób poprawy aktywności peptydów polegający na zastosowaniu tzw. „zszywek”, olefinowych łańcuchów węglowodorowych, które po kowalencyjnym związaniu ze sobą w reakcji metatezy (196) stabilizują i utrzymują peptyd w jego aktywnej formie (197) (Rysunek 63). „Zszywki” można wprowadzać w różnych lokalizacjach peptydu otrzymując jego analogi o odmiennej amfipatyczności i ładunku. Efekty „zszywania” skutkują zmianami właściwości biologicznych i biofizycznych peptydu. Wpływają na aktywność hemolityczną, przeciwbakteryjną, jak również podatność na degradację proteolityczną (198–201). W mysim modelu zapalenia otrzewnej i posocznicy wykazano, że „zszyty” peptyd może zabijać wielolekooporne bakterie Gram-ujemne bez zaobserwowania hemolizy i uszkodzenia nerek gospodarza (202).



Rysunek 63. Schemat stabilizacji α -helikalnego peptydu za pomocą „zszywek”.

5.2 Materiały i metody

5.2.1 Peptydy przeciwbakteryjne: anoplina, W-MreB₁₋₉ i peptyd penetrujący komórkę (KFF)₃K

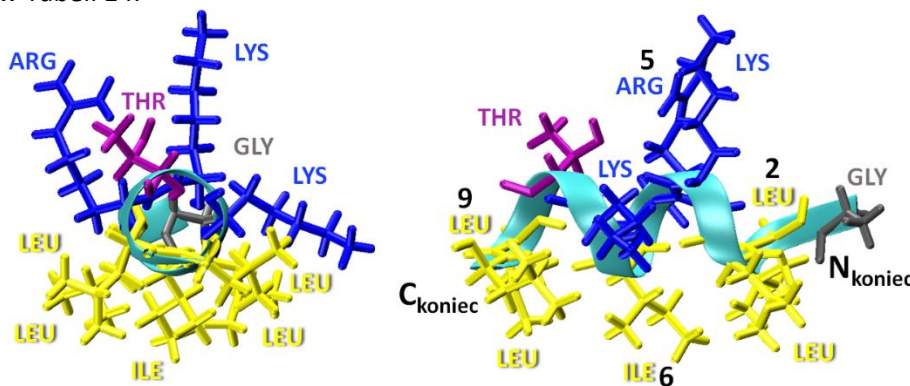
Peptydy zostały zsyntezowane manualnie i dostarczone przez dr Monikę Wojciechowską z Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, Centrum Nowych Technologii UW. Właściwości fizykochemiczne testowanych peptydów zestawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Sekwencja jednoliterowa peptydów i ich właściwości fizykochemiczne wyznaczone za pomocą kalkulatora *HeliQuest*.

Peptyd	Sekwencja N _{koniec} → C _{koniec}	Ładunek w pH 7.4 [e]	Hydrofobowość	Masa cząsteczkowa [g/mol]
anoplina	GLLKRIKTLL	+4	0,587	1153,5
W-MreB ₁₋₉	WMLKKFRGMF	+4	0,700	1342,7
(KFF) ₃ K	KFFKFFKFFK	+5	0,678	1525,1

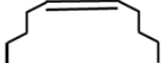
5.2.2 „Zszyte” pochodne anopliny

Peptydy zostały zsyntezowane manualnie i dostarczone przez mgr Julię Macyszyn z Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, Centrum Nowych Technologii UW. Strukturę oryginalnej anopliny przedstawia Rysunek 64, a właściwości fizykochemiczne peptydu i jego „zszytych” pochodnych zestawiono w Tabeli 14.



Rysunek 64. Model struktury anopliny – widok frontalny (po lewej) i boczny (po prawej) – pochodzi ze struktury PDB 2MJQ z RCSB Protein Data Bank. Jasnoniebieski – anoplina w reprezentacji α -helisy, ciemnoniebieski – aminokwasy polarne, dodatnio naładowane, hydrofilowe; fioletowy – aminokwas polarny o ładunku obojętnym, hydrofilowy; szary - aminokwas niepolarny o ładunku obojętnym, żółty – aminokwasy niepolarne o ładunku obojętnym, hydrofobowe. Cyframi zaznaczono aminokwasy podmienione w syntezie zmodyfikowaną alaninę użytą do wprowadzenia „zszywek”.

Tabela 14. Właściwości fizyczno-chemiczne anopliny i jej modyfikowanych pochodnych. Ładunek w pH 7,4 oraz procent helikalności zostały obliczone na podstawie widm dichroizmu kołowego peptydów w buforze fosforanowym (203) przy użyciu oprogramowania *DichroWeb* (204). S₅ – zmodyfikowana alanina z olefinowymi łańcuchami bocznymi.

Peptyd lub analog	Sekwencja $N_{\text{koniec}} \rightarrow C_{\text{koniec}}$	Forma	Ładunek w pH 7.4 [e]	Helikalność [%]
anoplina	Gly-Leu-Leu-Lys-Arg-Ile-Lys-Thr-Leu-Leu-NH ₂	liniowa	+4	14
anoplina[2-6]	 Gly-S ₅ -Leu-Lys-Arg-S ₅ -Lys-Thr-Leu-Leu-NH ₂	„zsyta”	+4	59
anoplina[5-9]	 Gly-Leu-Leu-Lys-S ₅ -Ile-Lys-Thr-S ₅ -Leu-NH ₂	„zsyta”	+3	64
anoplinaS ₅ (5,9)*	 Gly-Leu-Leu-Lys-S ₅ -Ile-Lys-Thr-S ₅ -Leu-NH ₂	liniowa	+3	62

* peptyd ze zmodyfikowanymi aminokwasami ale nie połączonymi kowalencyjnie (niezszytymi)

5.2.3 Szczepy bakterii

Szczepy bakterii wykorzystane do badań anopliny, W-MreB₁₋₉ i (KFF)₃K

Wpływ peptydów na wzrost bakterii zbadano na szczepie laboratoryjnym typu dzikiego *E. coli* K-12 (125) oraz szczepie z deficytem proteazy OmpT błony zewnętrznej (137). Enzym ten chroni komórki bakterii Gram-ujemnych przed szkodliwym działaniem kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, gdyż je degradowa (205).

Szczepy bakterii wykorzystane do badań anopliny i jej „zszytych” pochodnych

Wpływ stabilizacji struktury anopliny poprzez dodanie „zszywek” w wybranych pozycjach peptydu na aktywność przeciwbakteryjną jego pochodnych sprawdzono na szczepach bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich (Tabela 15). Wśród wykorzystanych bakterii znalazły się szczepy pierwszego i drugiego poziomu bezpieczeństwa biologicznego, BSL (ang. *BioSafety Level*). Grupę pierwszą (BSL 1) stanowią mikroorganizmy, które nie wywołują chorób u ludzi z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, a więc o minimalnym zagrożeniu dla zdrowia. Natomiast grupa druga (BSL 2) obejmuje patogeny o umiarkowanym zagrożeniu chorobotwórczym, jednak związane z zakażeniami występującymi u ludzi (206).

Tabela 15. Szczepy bakterii wykorzystane do badań anopliny i jej „zszytych” pochodnych.

Gatunek	Szczep	Opis	BSL
Gram-ujemne			
<i>Escherichia coli</i>	K-12 MG1655 (125)	szczep dziki, najpopularniejszy szczep laboratoryjny <i>E. coli</i>	1
	O157:H7 ST2-8624 (207)	produkuje toksyny Shiga, testowany szczep jest pozbawiony cech zjadliwości	2
	1841/06 (208)	szczep szpitalny ESBL+*	2
	WR3551/98 (209)	szczep szpitalny ESBL+*	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1 (210)	najpopularniejszy szczep laboratoryjny <i>P. aeruginosa</i>	2
	ATCC 27853 (211)	szczep szpitalny, szczep modelowy	2
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	LT2 (212)	mysi model ludzkiego duru brzuszego	2
Gram-dodatnie			
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 (213)	najpopularniejszy szczep laboratoryjny <i>S. aureus</i>	2
	ATCC BAA1720 (214)	szczep szpitalny MRSA**	2
<i>Bacillus subtilis</i>	168 (215)	szczep modelowy	1

*ESBL+ – β-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*)

**MRSA – oporne na metycylinę szczepy gronkowca (ang. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus*)

5.2.4 Hodowla bakterii

Szczepy bakterii wysiano na szalki LB z agarem (LA) i inkubowano przez noc w 37°C. Następnie, zaszczipiono po jednej kolonii z każdego szczepu, do płynnej pożywki LB i wytrząsano przy 600 rpm w 37°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) przez kolejną noc. Następnego dnia rozcieńczono hodowlę nocną 100-krotnie w pożywce MHB (Difco) i hodowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 600 rpm do osiągnięcia przez bakterie fazy wykładniczej o gęstości optycznej 0,2-0,3.

5.2.5 Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii

Przygotowano 96-dołkową, transparentną płytkę (Nunc) z pożywką MHB. Studzienki zawierające po 100 μ l czystej pożywki reprezentowały kontrolę sterylności. Do reszty studzienek dodano pożywkę z odpowiednimi stężeniami badanych związków do końcowej objętości po 50 μ l. Ostateczne stężenia badanych związków osiągnięto metodą seryjnych rozcieńczeń zgodnie ze standardami CLSI według metody M07-A10 (49). Dla peptydów (anoplina, W-MreB₁₋₉, (KFF)₃K) oraz kontrolnych antybiotyków (ampicylina i tetracyklina, Sigma Aldrich) zakres stężeń wynosił 0.5–256 μ M, zaś do badań zsztych pochodnych anopliny i antybiotyków kontrolnych (ampicylina, kanamycyna i polimyksyna B, Sigma Aldrich) wynosił 0.125–64 μ M. Bakterie z fazy wykładniczej rozcieńczono 100-krotnie, do $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml w pożywce MHB i dopełniono nimi studzienki do końcowej objętości po 100 μ l. Kontrola wzrostu zawierała rozcieńczone bakterie oraz pożywkę w stosunku 1:1.

5.2.6 Monitorowanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii przez anoplinę, W-MreB₁₋₉ i (KFF)₃K

Płytki zawierające anoplinę, W-MreB₁₋₉ i (KFF)₃K były inkubowane w 37°C w czytniku mikropłytek Sunshine Tecan przez 20 godzin. Gęstość optyczna rozcieńczeń była mierzona co 10 minut przy długości fali 600 nm w programie Magellan 6. Każdy pomiar był poprzedzany 10-sekundowym wytrząsaniem płytki w celu równomiernego rozprowadzenia bakterii w całym podłożu studzienki. Pojedynczy eksperyment został przeprowadzony w co najmniej 4 niezależnych powtórzeniach biologicznych i 2 technicznych.

5.2.7 Monitorowanie minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii przez anoplin i jej „zszyte” pochodne

Płytki zawierające anoplinę i jej „zszyte” pochodne (anoplina[2-6], anoplina[5-9], anoplinaS₅(5,9)) wytrząsano przy 165 rpm (Incubator Shaker Series, Innova 44) w 37°C przez 19 godzin. Po tym czasie, do każdej studzienki dodano resazurin (0.2 mg/ml, 20 μ l, Sigma-Aldrich) i wytrząsano przez kolejną godzinę. Wartości MIC zweryfikowano na dwa sposoby – wzrokowo ze wsparciem standardowych pomiarów gęstości optycznej przy 600 nm oraz przez obserwację zmiany koloru pożywki po dodaniu resazurinu (fioletowy – bakterie martwe, różowy – bakterie żywe). Każdy eksperyment został przeprowadzony w przynajmniej trzech powtórzeniach biologicznych dla peptydów i jednym dla antybiotyków kontrolnych.

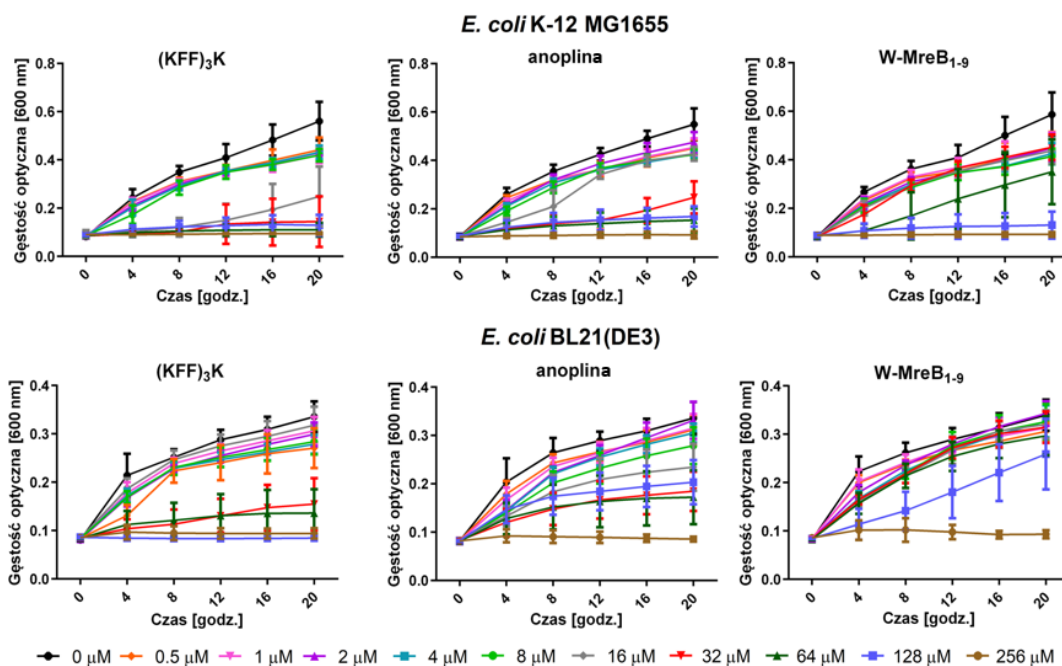
5.2.8 Analiza statystyczna

Analizę wartości absorbancji przeprowadzono w programie Microsoft Excel. Analizę statystyczną przeprowadzoną za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA oraz wykresy wykonano w GraphPad 7 Prism.

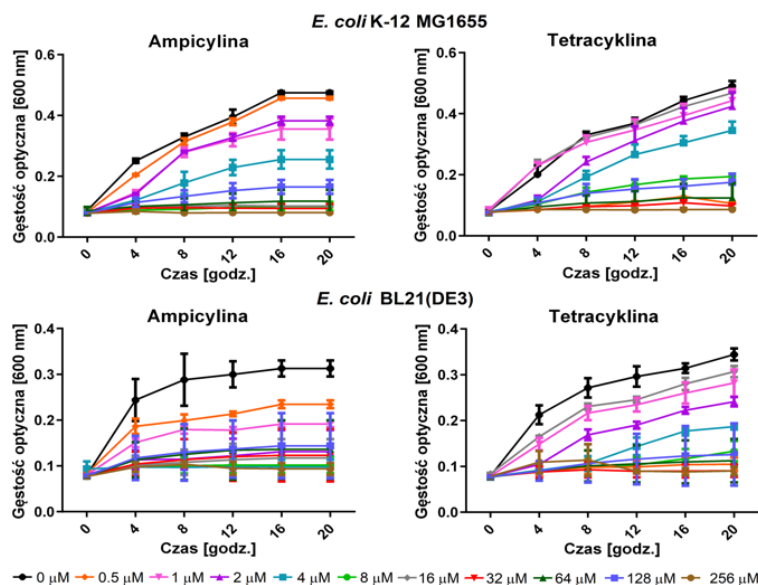
5.3 Wyniki

5.3.1 Hamowanie wzrostu szczepów *E. coli* przez peptydy i antybiotyki kontrolne

Sprawdzono wrażliwość szczepów *E. coli* K-12 MG1655 i BL21(DE3) na trzy peptydy: (KFF)₃K, anoplina i W-MreB₁₋₉ (Rysunek 65), a następnie porównano do działania tradycyjnych antybiotyków kontrolnych: ampicyliny i tetracykliny (Rysunek 66). Wykresy kinetyczne obrazują wpływ różnych stężeń badanego związku na zmiany we wzroście bakterii lub jego zahamowanie w ciągu 20 godzin hodowli.



Rysunek 65. Hamowanie wzrostu szczepów *E. coli* pod wpływem peptydów: (KFF)₃K, anoplina i W-MreB₁₋₉ w ciągu 20 godzin inkubacji. Pokazano średnie wartości (n = 4) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM.



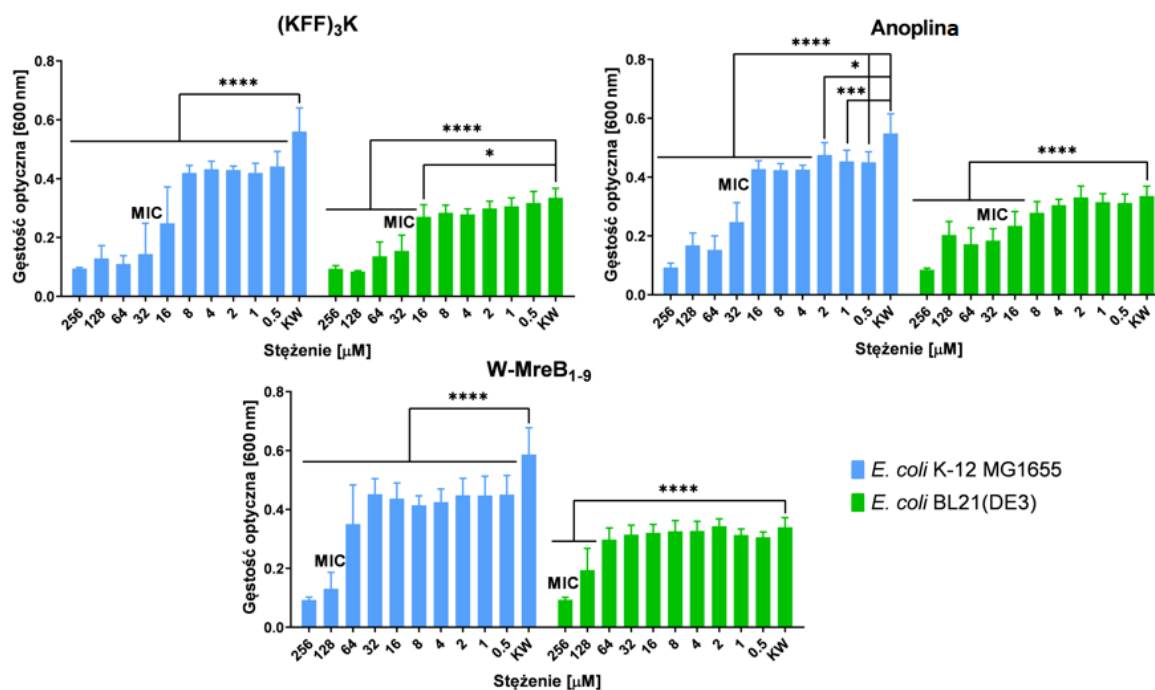
Rysunek 66. Hamowanie wzrostu szczepów *E. coli* pod wpływem antybiotyków kontrolnych: ampicyliny i tetracykliny w ciągu 20 godzin inkubacji. Pokazano średnie wartości (n = 4) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM.

5.3.2 Minimalne stężenie hamujące peptydów: (KFF)₃K, anoplina, W-MreB₁₋₉ oraz antybiotyków kontrolnych na szczepach *E. coli* K-12 i BL21(DE3)

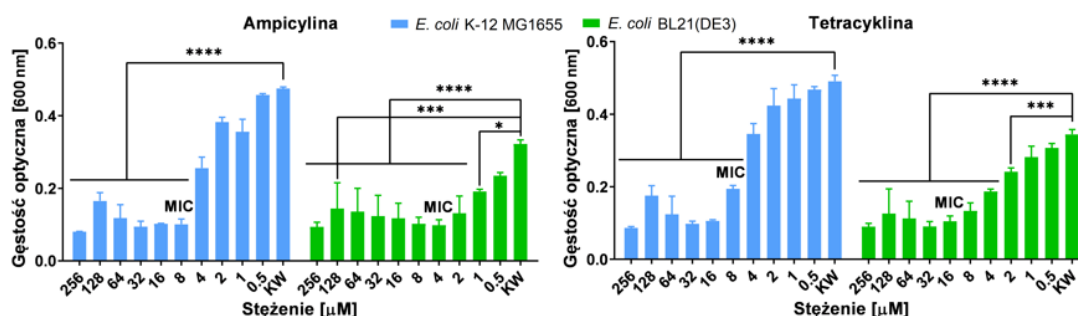
Wyznaczenie wartości MIC odbyło się poprzez ocenę mętności hodowli bakterii. Wartość MIC była pierwszym stężeniem związku, przy którym zaobserwowano wyraźnie transparentną, klarowną pożywkę bez jakiegokolwiek mętności, która świadczyłaby o dalszym wzroście komórek bakteryjnych. Wartości liczbowe zestawiono w Tabeli 16, a wykresy słupkowe na Rysunkach 67 i 68. MIC peptydów (KFF)₃K i anoplina wyniósł 32 μM i był taki sam dla obydwu szczepów *E. coli*. Peptyd W-MreB₁₋₉ wykazał wysokie wartości MIC – 128 μM dla *E. coli* K-12 MG1655 i 256 μM dla *E. coli* BL21(DE3). Obydwa antybiotyki kontrolne miały niższy MIC niż którykolwiek ze zbadanych peptydów. Wynosi on po 8 μM w szczepie dzikim oraz 4 μM i 16 μM, odpowiednio dla ampicyliny i tetracykliny w szczepie *E. coli* BL21(DE3).

Tabela 16. Wyniki MIC badanych związków na wybranych szczepach *E. coli*.

Szczep bakterii	MIC [μM]				
	Peptyd			Antybiotyk	
	(KFF) ₃ K	Anoplina	W-MreB ₁₋₉	Ampicylina	Tetracyklina
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	32	32	128	8	8
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	32	32	256	4	16



Rysunek 67. Wpływ peptydów: (KFF)₃K, anoplina, W-MreB₁₋₉ na wzrost szczepów *E. coli* po 20 godzinach inkubacji. Kontrola sterylności pożywki (nie pokazano) była przejrzysta, jak w przypadku inkubacji w 256 μM peptydu. Pokazano średnie wartości (n = 4) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi peptyd i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** P < 0,0001, *** P < 0,001, * P < 0,05), pozostałe nie są istotne statystycznie.



Rysunek 68. Wpływ antybiotyków kontrolnych na wzrost szczepów *E. coli* po 20 godzinach inkubacji. Kontrola sterylności pożywki (nie pokazano) była przejrzysta, jak w przypadku inkubacji w 256 μM antybiotyku. Pokazano średnie wartości ($n = 4$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi antybiotyk i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie.

Biorąc pod uwagę wysokie wartości MIC dla W-MreB₁₋₉ zrezygnowano z dalszych badań nad tym peptydem. Peptydy (KFF)₃K i anopliny wybrano do dalszych badań związanych z ich modyfikowaniem za pomocą techniki „zszywania”. Aktywność przeciwbakteryjna tych peptydów też jest dosyć słaba (MIC = 32 μM), ale właśnie stabilizacja ich struktury drugorzędowej powinna ją poprawić. W niniejszej pracy omówiono eksperymenty wyłącznie na „zszytych” pochodnych anopliny.

5.3.3 Minimalne stężenie hamujące peptydu anopliny, jego „zszytych” pochodnych oraz antybiotyków kontrolnych na szczepach bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich.

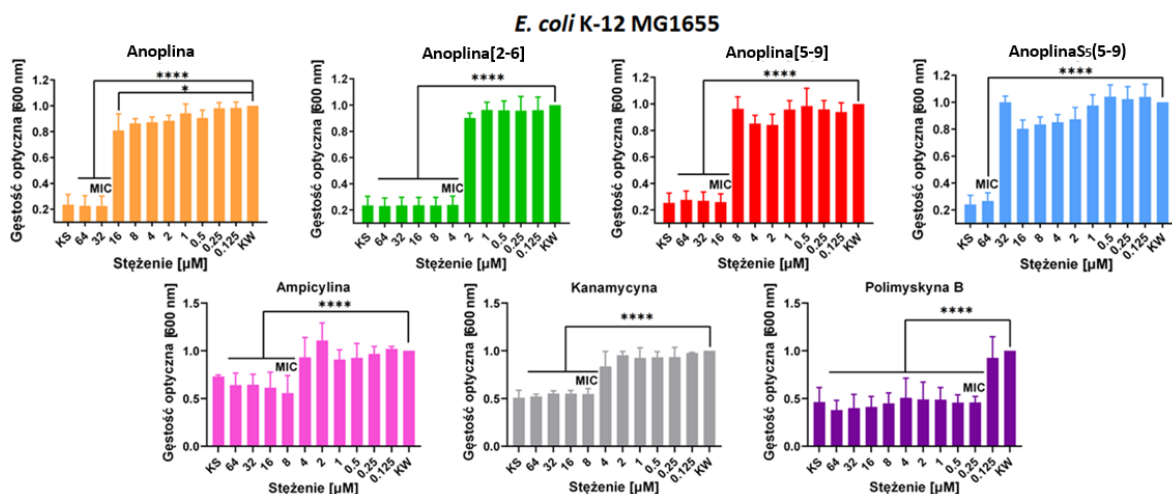
Zaprojektowano i zsyntezowano pochodne anopliny z modyfikacjami wprowadzonymi w różnych miejscach jej sekwencji (203). Otrzymano dwie pochodne z zamkniętym pierścieniem stabilizującym strukturę helikalną peptydu: anoplina[2-6] i anoplina[5-9] oraz jedną „niezsytą”, liniową cząsteczkę posiadającą dwa nienaturalne aminokwasy zawierające olefinowe łańcuchy boczne – anoplinaS₅(5,9) (Tabela 14).

Do sprawdzenia aktywności zsyntezowanych analogów anoplinu wykorzystano szczepy Gram-ujemne i Gram-dodatnie bakterii patogennych BSL 2 oraz niepatogennych BSL 1. Użyto trzech antybiotyków kontrolnych: ampicyliny, kanamycyny oraz polimyksyny B. Wartości MIC zebrano w Tabeli 17 i pogrubiono te, które były niższe od MIC niezmodyfikowanej anopliny. Wyniki z ostatniej godziny pomiaru przedstawiono oddzielnie dla każdego szczepu na rysunkach 69-78. W opisach skupiono się na modyfikowanych anoplinach, które wykazały większą aktywność przeciwbakteryjną w stosunku, zarówno do oryginalnego peptydu, jak również do antybiotyków konwencjonalnych, które działały słabiej od niego. Ze względu na zmianę sposobu inkubacji mikropłytek udało się otrzymać wiarygodne wartości kontroli sterylności i umieścić na wykresach słupkowych (Rysunek 69-78). Wyniki zostały znormalizowane do kontroli wzrostu.

Tabela 17. Wyniki MIC badanych związków na wybranych szczepach bakterii Gram-ujemnych i Gram - dodatnich.

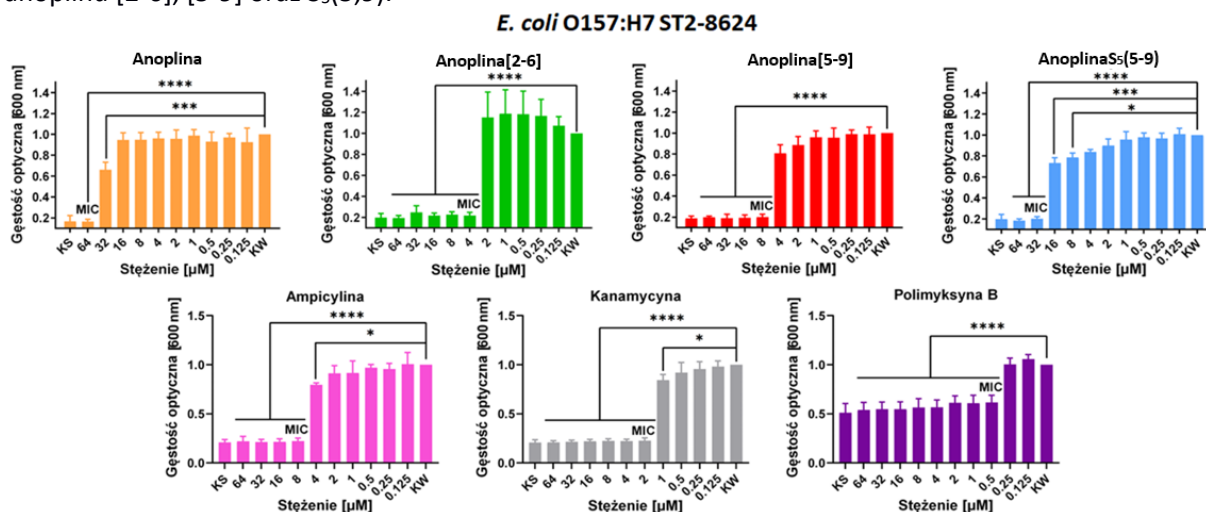
Szczep bakterii	MIC [μ M]						
	Peptyd				Antybiotyk		
	Anoplina	Anoplina [2-6]	Anoplina [5-9]	Anoplina S ₅ (5,9)	Ampicylina	Kanamycyna	Polimyksyna B
Gram-ujemne							
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	32	4	16	64	8	8	0,25
<i>E. coli</i> O157:H7 ST2-8624	64	4	8	32	8	2	0,5
<i>E. coli</i> 1841/06	64	4	8	32	>64	>64	0,25
<i>E. coli</i> WR3551/98	64	4	16	64	>64	>64	0,5
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	16	8	16	64	>64	>64	0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	32	16	32	>64	>64	>64	0,25
<i>S. Typhimurium</i> LT2	64	8	32	>64	>64	>64	0,5
Gram-dodatnie							
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>64	64	4	8	8	4	>64
<i>S. aureus</i> ATCC BAA1720 MRSA	>64	>64	4	8	>64	>64	>64
<i>B. subtilis</i> 168	16	2	4	8	0.125	0.25	2

Szczep dziki wykazał większą wrażliwość na „zsyte” analogi [2-6] i [5-9] w stosunku do oryginalnego peptydu (32 μ M) zmniejszając wartość MIC, kolejno 8- i 2-krotnie (Rysunek 69). Anoplina[2-6] zadziałała 2-krotnie efektywniej niż ampicylina i kanamycyna.



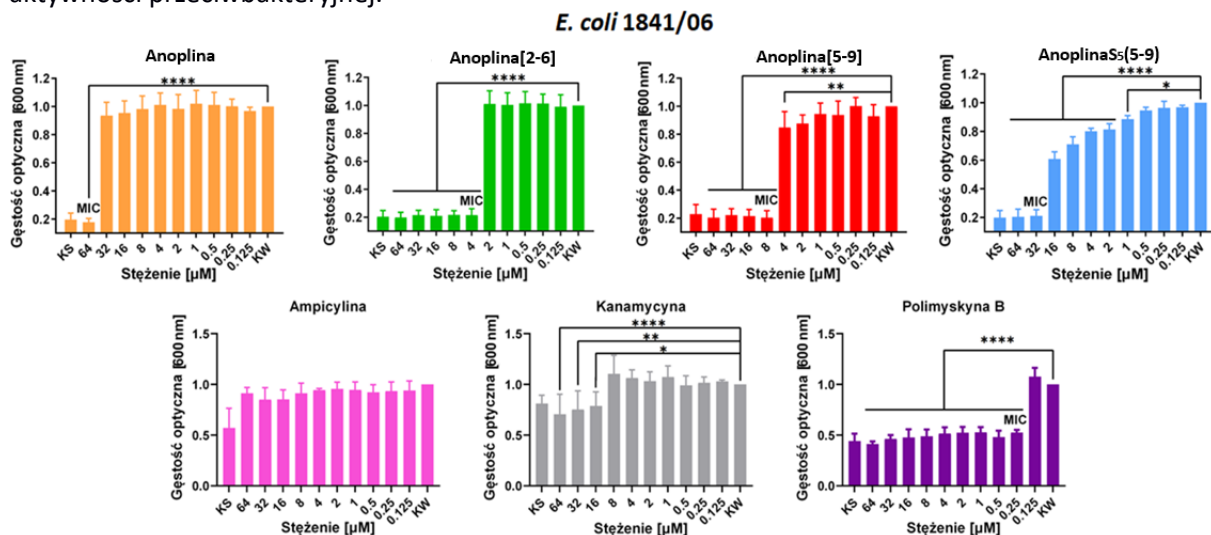
Rysunek 69. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *E. coli* K-12 MG1655. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Wszystkie zmodyfikowane pochodne anopliny spowodowały zmniejszenie wartości MIC u *E. coli* O157:H7 ST2-8624 (Rysunek 70) z wartości 64 μM . Zmiany były 16-, 4- i 2-krotne odpowiednio dla anoplinu [2-6], [5-9] oraz S₅(5,9).



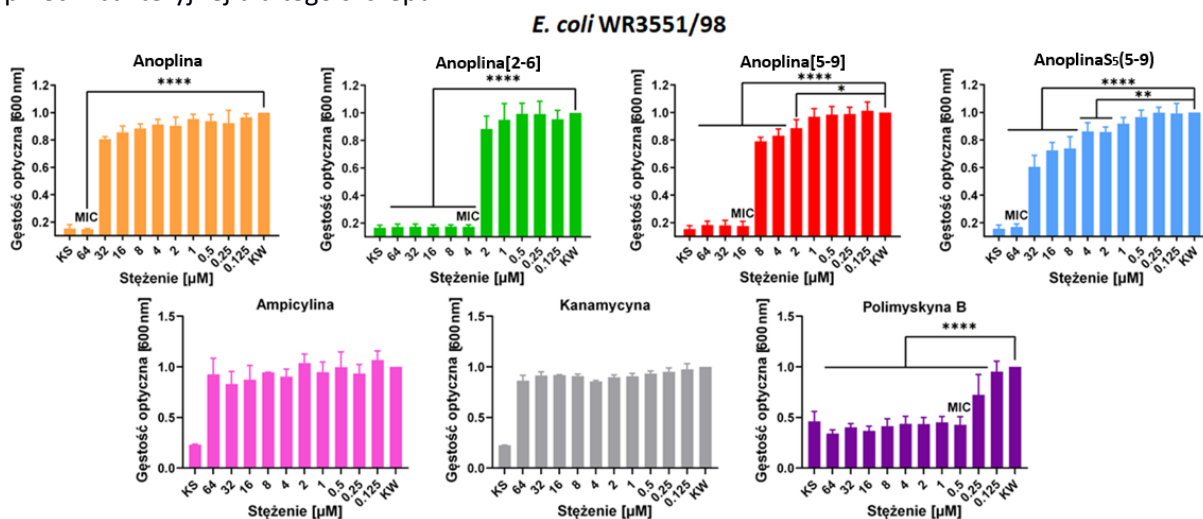
Rysunek 70. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *E. coli* O157:H7 ST2-8624. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Szczep *E. coli* 1841/06 wykazał identyczny stopień wrażliwości na „zsyte” anopliny, jak szczep *E. coli* O157:H7 ST2-8624 (Rysunek 71). Wartości MIC zmniejszyły się z 64 μM , 16-, 4- i 2-krotnie dla anoplinu [2-6], [5-9] oraz S₅(5,9). Dla tego szczepu ampicylina i kanamycyna nie wykazały żadnej aktywności przeciwbakteryjnej.



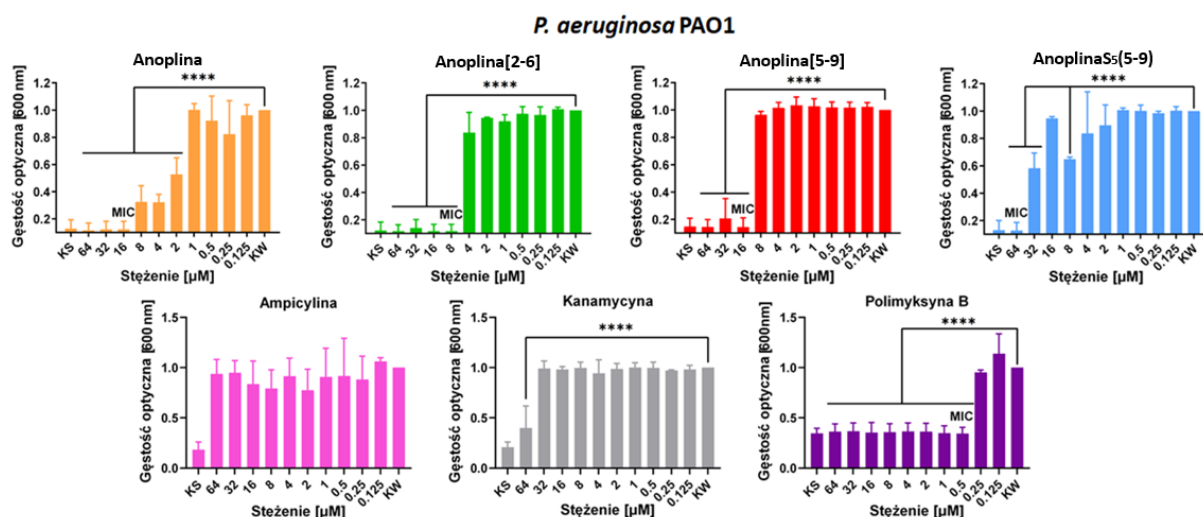
Rysunek 71. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *E. coli* 1841/06. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Anoplina[2-6] spowodowała 16-krotne zmniejszenie wartości MIC w szczepie *E. coli* WR3551/98 (Rysunek 72), a anoplina „zsyta” w pozycji [5-9] 4-krotnie w stosunku do niemodyfikowanej anopliny (64 μ M). Ampicylina i kanamycyna nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej dla tego szczepu.



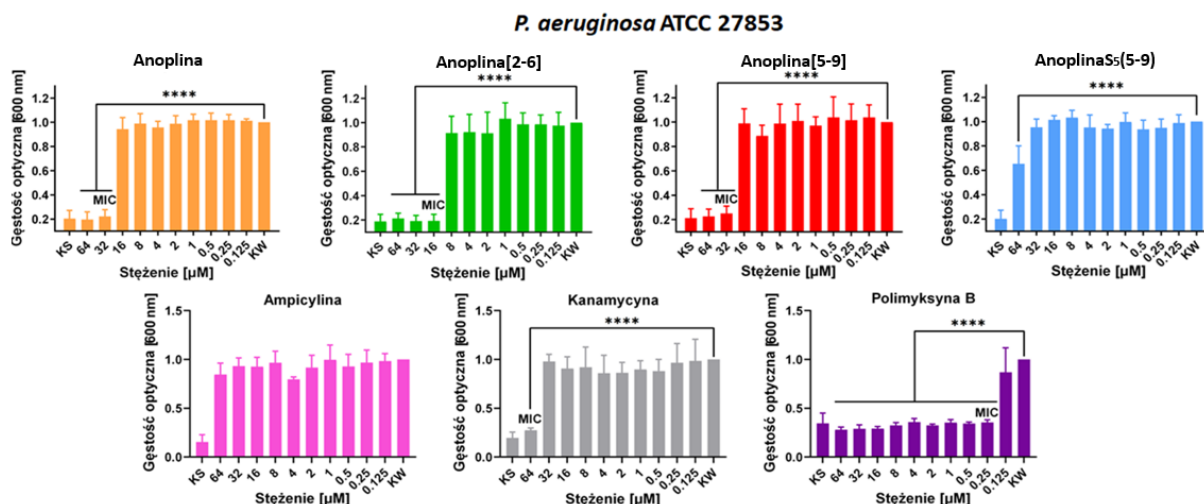
Rysunek 72. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *E. coli* WR3551/98. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Szczep *P. aeruginosa* PAO1 (Rysunek 73) okazał się najbardziej wrażliwy na niemodyfikowaną anoplinę, której MIC wyniósł 16 μ M. Tę samą wartość wykazała anoplina[5-9], a 2-krotnie mniejszą anoplina[2-6]. W tym przypadku modyfikacje anopliny nie spowodowały poprawy aktywności przeciwbakteryjnej. Ampicylina i kanamycyna również nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej w tym szczepie.



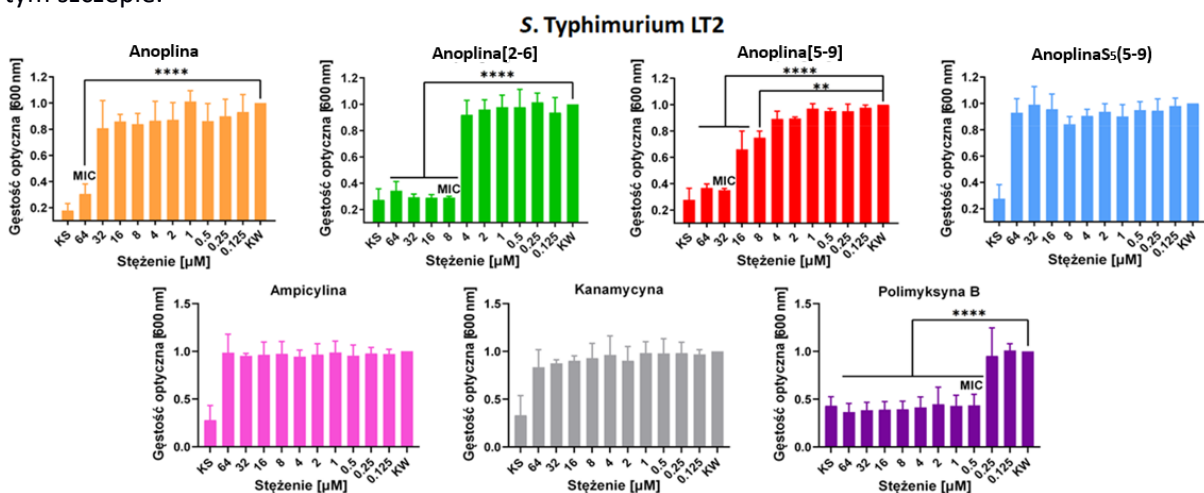
Rysunek 73. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *P. aeruginosa* PAO1. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Szczep *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Rysunek 74) wykazał tę samą wrażliwość dla niezmodyfikowanej anopliny MIC (32 μ M) oraz zmodyfikowanej anopliny w pozycji [5-9], a jedynie 2-krotnie większą wrażliwość dla anopliny[2-6]. Ampicylina nie wykazała aktywności przeciwbakteryjnej, natomiast kanamycyna dała MIC 2-krotnie wyższy niż anoplina.



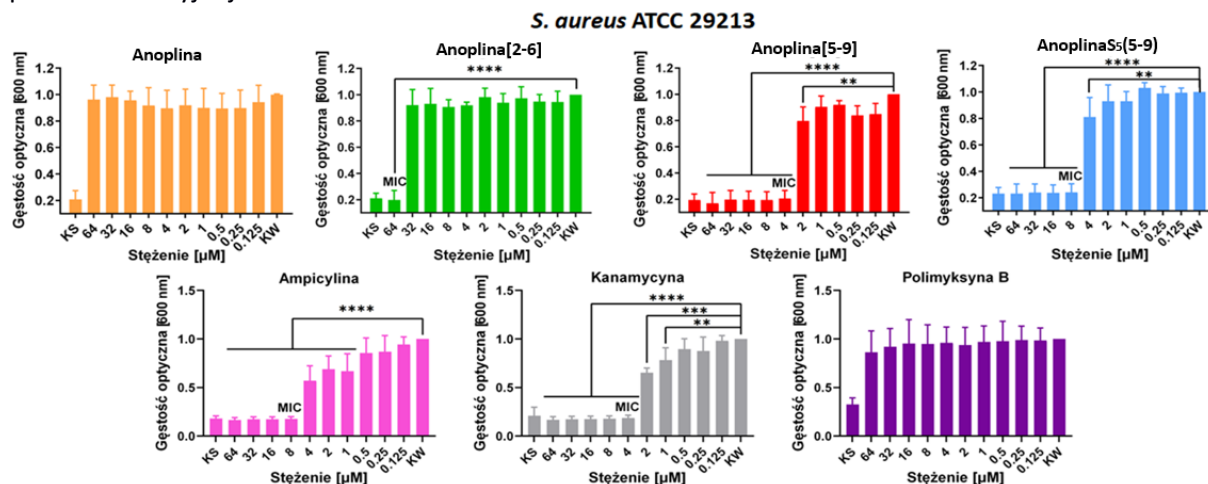
Rysunek 74. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

„Zsycie” anopliny w pozycjach 2 i 6 oraz 5 i 9 obniżyło MIC anopliny dla szczepu *S. Typhimurium* LT2 (Rysunek 75), odpowiednio, 8-krotnie i 2-krotnie z początkowej wartości 64 μ M anopliny niezmodyfikowanej. Ampicylina i kanamycyna nie wykazały aktywności przeciwbakteryjnej w tym szczepie.



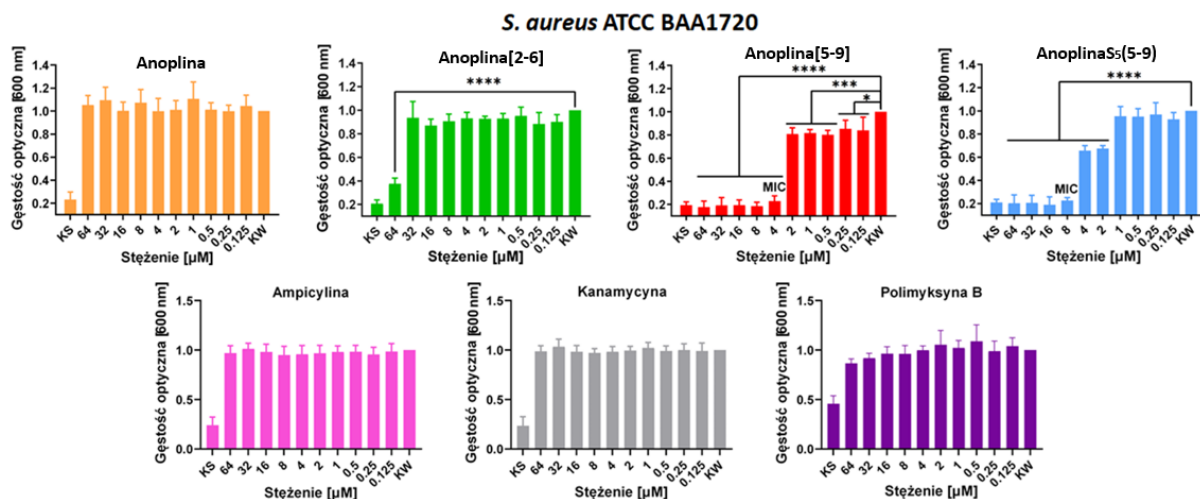
Rysunek 75. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *S. Typhimurium* LT2. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Nie zaobserwowano aktywności przeciwbakteryjnej anopliny dla szczepu *S. aureus* ATCC 29213 (Rysunek 76) do stężenia 64 μM włącznie. Natomiast jej modyfikacje pozwoliły zaobserwować wartości MIC: 64 μM , 8 μM i 4 μM , odpowiednio dla modyfikowanych peptydów w pozycjach: [2-6], $S_5(5,9)$ i [5-9]. Aktywność przeciwbakteryjna anoplinu $S_5(5,9)$ okazała się równa aktywności ampicyliny, a aktywność anoplinu[2-6] równa aktywności kanamycyny. Polimyksyna B nie wykazała aktywności przeciwbakteryjnej.



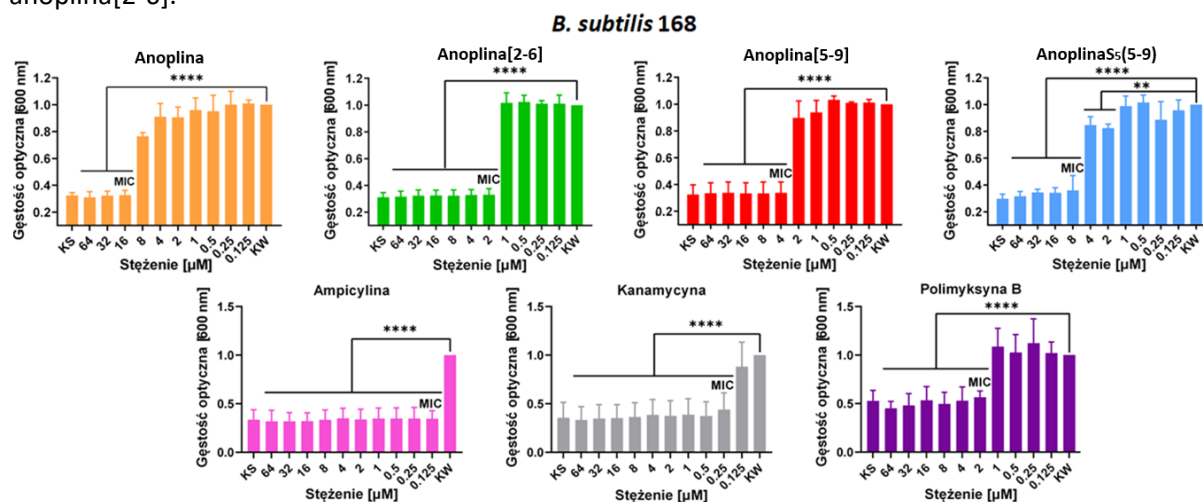
Rysunek 76. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *S. aureus* ATCC 29213. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Tak jak w przypadku szczepu *S. aureus* ATCC 29213 nie znaleziono wartości MIC anopliny dla opornego szczepu *S. aureus* ATCC BAA1720 MRSA (Rysunek 77) do stężenia 64 μM włącznie. Wyznaczono jednak wartość MIC równą 4 μM dla anopliny[5-9] i 8 μM dla anopliny $S_5(5,9)$. Żaden z tradycyjnych antybiotyków nie wykazał aktywności przeciwbakteryjnej na tym szczepie.



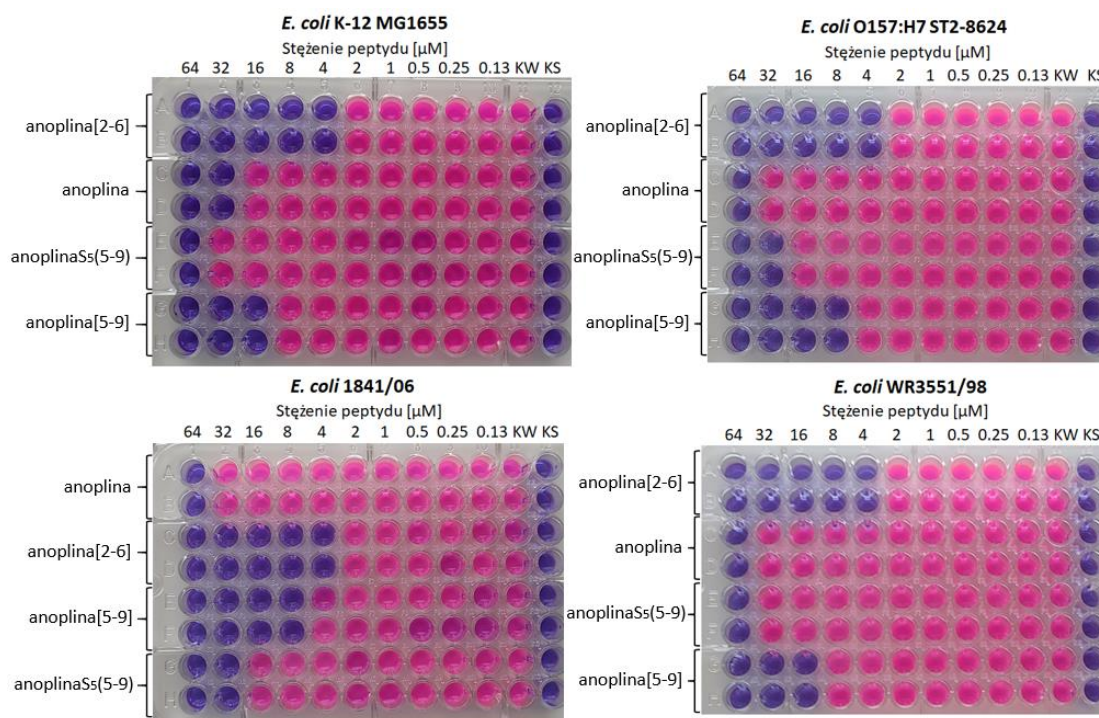
Rysunek 77. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *S. aureus* ATCC BAA1720 MRSA. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

Tak jak w szczepie *P. aeruginosa* PAO1 (Rysunek 78), niemodyfikowana anoplina wykazała MIC 16 μM również dla szczepu *B. subtilis* 168. Jednak w tym przypadku modyfikowane pochodne uzyskały najniższe wartości MIC ze wszystkich szczepów. Wyniosły one 2 μM , 4 μM i 8 μM kolejno dla modyfikacji w pozycjach [2-6], [5-9] i $S_5(5,9)$. Wszystkie antybiotyki kontrolne osiągnęły wyższą aktywność przeciwbakteryjną. Niemniej jednak, polimyksyna B wykazała identyczny MIC, co anoplina[2-6].

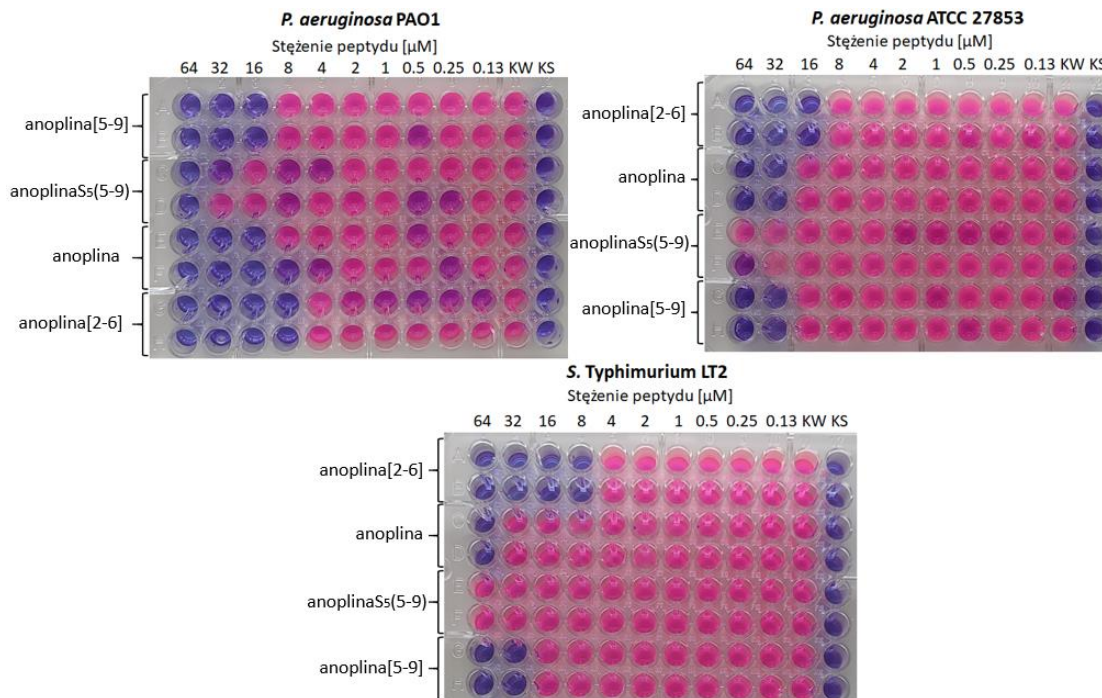


Rysunek 78. Wpływ peptydów i antybiotyków kontrolnych na wzrost *B. subtilis* 168. Pokazano średnie wartości ($n = 3$) ze słupkami błędów obliczonymi jako SEM. Różnice gęstości optycznej pomiędzy bakteriami zawierającymi dany związek i kontrolą wzrostu (KW) są istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$), pozostałe nie są istotne statystycznie. KS – kontrola sterylności.

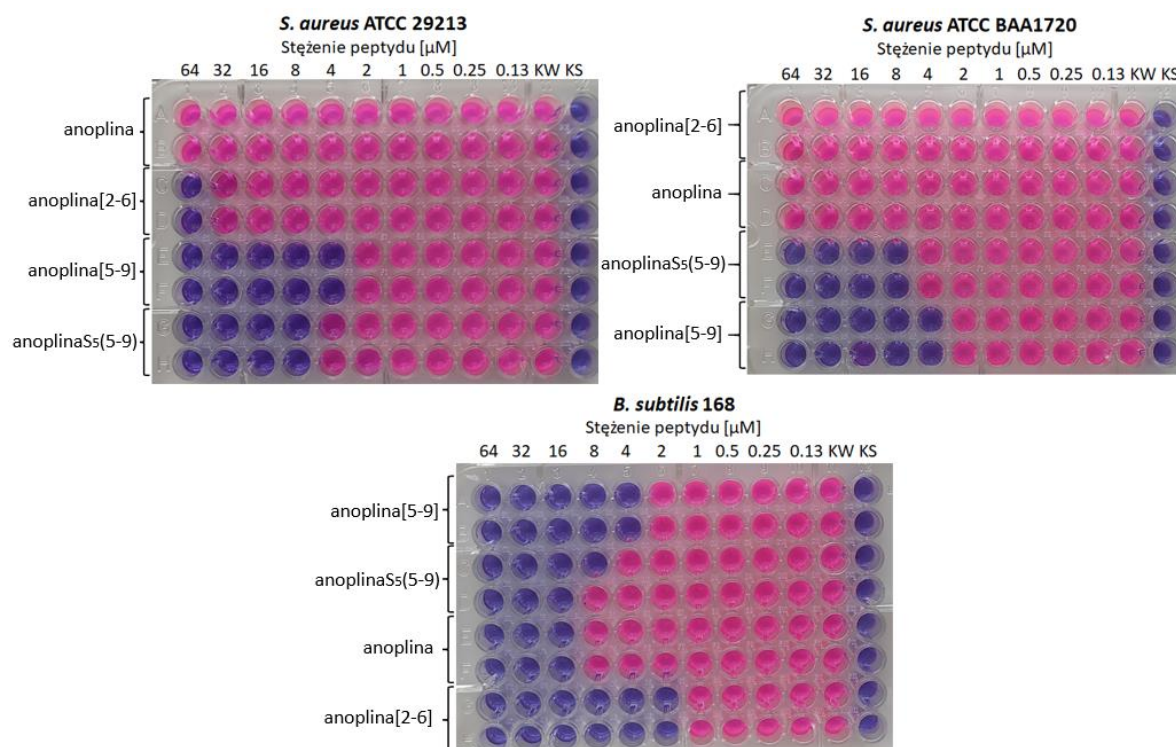
Po wyznaczeniu wartości MIC bakterie inkubowano z resazurinem, by potwierdzić otrzymane wyniki. Na rysunkach 79-81 pokazano reprezentatywne mikropłytki dla każdego szczepu inkubowanego z anoplina i jego trzema pochodnymi. W każdym przypadku wartość MIC wyznaczona z absorbancji została potwierdzona odpowiednią barwą resazurinu.



Rysunek 79. Reprezentatywne mikropłytki z hodowlami bakterii Gram-ujemnych szczepów *E. coli* inkubowanymi z anoplina i jej „zszytymi” pochodnymi, wybarwionymi resazurinem przez 1 godzinę. KW – kontrola wzrostu, KS – kontrola sterylności pożywki. Barwa fioletowa – nieżywe bakterie lub czysta pożywka, barwa różowa – żywe bakterie.



Rysunek 80. Reprezentatywne mikropłytki z hodowlami bakterii Gram-ujemnych szczepów *P. aeruginosa* i *Salmonella* inkubowanymi z anoplina i jej „zszytymi” pochodnymi, wybarwionymi resazurinem przez 1 godzinę. KW – kontrola wzrostu, KS – kontrola sterylności pożywki. Barwa fioletowa – nieżywe bakterie lub czysta pożywka, barwa różowa – żywe bakterie.



Rysunek 81. Reprezentatywne mikropłytki z hodowlami bakterii Gram-dodatnich szczepów *S. aureus* i *B. subtilis* inkubowanymi z anopliną i jej „zszytymi” pochodnymi, wybarwionymi resazurinem przez 1 godzinę. KW – kontrola wzrostu, KS – kontrola sterylności pożywki. Barwa fioletowa – nieżywe bakterie lub czysta pożywka, barwa różowa – żywe bakterie.

Oryginalny naturalny peptyd anoplina wykazał niską aktywność przeciwbakteryjną (MIC między 16, a 64 μM) wobec wszystkich przebadanych szczepów. W analogu [2-6] podmieniono dwa hydrofobowe aminokwasy, leucynę oraz izoleucynę, zmodyfikowanymi alaninami zawierającymi łańcuchy olefinowe. Analogi z podstawnikami w miejscach 5 i 9 utraciły hydrofobową leucynę i hydrofilową arginę. Porównując finalne sekwencje zmodyfikowanych pochodnych widać, że różnią się one hydrofilowością. W peptydzie anoplina[2-6] występuje arginina nadająca temu peptydowi bardziej hydrofilowy charakter niż w drugim analogu, w którym obecność izoleucyny nadaje charakter bardziej hydrofobowy. Wprowadzenie zszywek w pozycjach 2-6 oraz 5-9 znacząco poprawiło działanie anoplina przeciw bakteriom Gram-ujemnym zmniejszając wartość MIC od 4 do 16 razy, przy czym anoplina[2-6] okazał się dwukrotnie lub czterokrotnie skuteczniejszy niż anoplina[5-9]. „Zszyte” pochodne wykazały się wyższą (w większości przypadków) lub równą aktywnością przeciwbakteryjną wobec szczepów Gram-ujemnych w porównaniu do ampicyliny i kanamycyny. AnoplinaS₅(5,9) wykazała niższą aktywność niż niemodyfikowana anoplina w stosunku do większości szczepów Gram-ujemnych i od 2 do ponad 8 razy lepszą wobec szczepów Gram-dodatnich. Anoplina[5-9] również poprawił wartość MIC u szczepów Gram-dodatnich od 4 do ponad 16 razy. W przypadku anoplina[2-6] nie zaobserwowano skutecznej aktywności przeciwbakteryjnej wobec szczepów *S. aureus*. Jedynym szczepem Gram-dodatnim, w którym zaobserwowano niski MIC dla wszystkich pochodnych anoplina był *B. subtilis* 168, ale był on bardziej wrażliwy również na tradycyjne antybiotyki.

Uzyskane wyniki pokazują, że tego typu modyfikacje wprowadzane do peptydów poprawiają ich działanie przeciwbakteryjne. Wprowadzanie „zszywek” w różnych pozycjach anoplina pozwoliło stworzyć jej pochodne skuteczne w hamowaniu wzrostu nawet lekoopornych szczepów bakterii, takich jak szczepy wytwarzające β -laktamazy (*E. coli* 1841/06 ESBL+, *E. coli* WR3551/98 ESBL+) czy też szczepy gronkowca odporne na metycylinę (*S. aureus* ATCC BAA1720 MRSA).

5.4 Dyskusja

Badane peptydy zbudowane z aminokwasów hydrofilowych i hydrofobowych: anoplina, W-MreB₁₋₉ oraz (KFF)₃K są dodatnio naładowane i mają zbliżoną hydrofobowość (Tabela 13). Peptydy wykazały słabą aktywność przeciwbakteryjną (Tabela 16), zwłaszcza W-MreB₁₋₉, którego MIC wyniósł 128 μ M w szczepie dzikim oraz 256 μ M na szczepie bez proteazy OmpT. Są to znacznie większe wartości niż dostępne w literaturze stężenie dla *E. coli* równe 5 μ M. Jednak eksperyment ten nie był prowadzony w podłożu do hodowli bakterii, a w buforze fosforanowym (189), więc nie może mieć przełożenia na wyniki otrzymane w niniejszej rozprawie. W każdym testowanym szczepie MIC anopliny i (KFF)₃K wyniósł po 32 μ M. W przypadku (KFF)₃K odtworzono wcześniej otrzymane wartości dla szczepu K-12 (124,141,142,192). W literaturze wyznaczono wartości MIC anopliny na różnych szczepach *E. coli*: 16 μ M (216), 23 μ M (217), 32 μ M (216,218), 36 μ M (219), 43 μ M (185), 64 μ M (216,220) i 246 μ M (221). Ze względu na dosyć słabą aktywność przeciwbakteryjną obydwu omawianych peptydów oraz przynależność anopliny do AMP wybrano ją do stabilizacji łańcuchami olefinowymi i badań aktywności przeciwbakteryjnej. Wówczas, badania zahamowania wzrostu przeprowadzono również na innych bakteriach (Tabela 17), a następnie, znaleziono w literaturze wyniki otrzymane dla tych samych gatunków bakterii. Wśród szczepów Gram-ujemnych wyznaczono MIC: 4 i 8 μ M (216), 17 μ M (185), 32 μ M (220) oraz 171 μ M (221) dla *P. aeruginosa*, a wśród Gram-dodatnich 4 i 43 μ M (185), 11 μ M (217), 18 μ M (219), 64 μ M (216,220) oraz 512 μ M (221) dla *S. aureus* oraz 8 μ M (216), 16 μ M (218), 17 μ M i 32 μ M (220) dla *B. subtilis* (185). Duże różnice między wartościami MIC mogą być spowodowane hodowlą bakterii w różniących się podłożach i wykorzystaniem innych szczepów w obrębie tego samego gatunku niż w niniejszej pracy. W przypadkach, gdzie w danych literaturowych wartości MIC były podane w μ g/ml (185,219) przeliczono je korzystając z masy anopliny 1153,5 g/mol (Tabela 13).

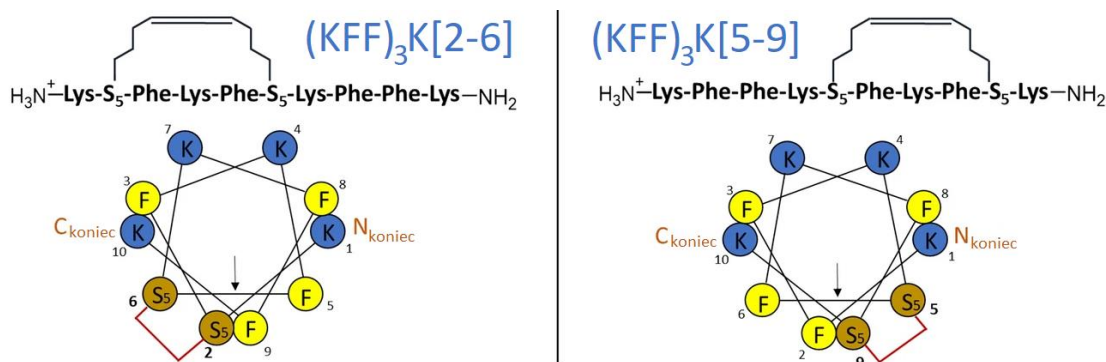
Zarówno „zsytycie” anopliny, jak już samo wprowadzenie wolnych łańcuchów węglowodorowych podniosło jej helikalność o około 50% w stosunku do liniowego peptydu wyjściowego (Tabela 14). Tendencja ta jest zgodna z danymi literaturowymi dla „zsywanego” peptydu (198). W przeciwieństwie do peptydów niemodyfikowanych (anoplina, W-MreB₁₋₉ i (KFF)₃K) wykazano zależność między strukturą drugorzędową anopliny i jej „zsytych” pochodnych, a jej stabilnością. Większa zawartość helisy skutkowała lepszą odpornością na trawienie enzymami proteolitycznymi (203).

Dodatni ładunek peptydów jest konieczny, aby mogły zbliżyć się one do ścian komórek bakterii zawierających na swojej powierzchni naładowane ujemnie łańcuchy LPS, kwasów tejchojowych (TA) i lipotejchojowych (LTA). Wszystkie „zsyte” peptydy testowane w pracy mają charakter kationowy (Tabela 14), więc mają możliwość „dotarcia” do obydwu typów osłon bakteryjnych i oddziaływać elektrostatycznych z ich anionowymi elementami. LPS występujący w szczepach Gram-ujemnych chroni komórkę przed szkodliwym działaniem peptydów hydrofobowych (179). Wyjaśnia to gorsze działanie bardziej hydrofobowych analogów zmodyfikowanych w miejscach 5 i 9 w porównaniu z aktywnością pochodnej [2-6]. W badaniach *in vitro* wykazano, że w środowisku LPS to właśnie analog [2-6] przyjmuje najbardziej helikalną strukturę spośród wszystkich pochodnych (203). Z kolei silnie hydrofilowe kwasy tejchojowe w szczepach Gram-dodatnich mogą sprzyjać wiązaniu i zatrzymywaniu bardziej hydrofilowej anopliny [2-6] w swojej strukturze i nie dopuścić do przedostania się peptydu do części cytoplazmatycznej. Dopiero duże stężenie tego analogu nagromadzone w warstwie fosfolipidowej może prowadzić do zakłócenia struktury błony. W przypadku anopliny [5-9] oraz S₅(5,9) kwasy tejchojowe mogą pośredniczyć w przedostawaniu się peptydów w kierunku błony cytoplazmatycznej, a kwasy lipotejchojowe pomóc peptydom przeniknąć w głąb komórki. Ponadto, sam peptydoglikan może ułatwiać transport AMP do cytoplazmy (222).

W obrębie tego samego typu ścian komórkowych bakterii można zauważyć różnice w działaniu pochodnych anopliny. Jest to szczególnie widoczne w przypadku analogu [2-6] w szczepach Gram-dodatnich. Anoplina [2-6] wykazuje co najmniej 32-razy większy MIC (≥ 64 μ M) dla *S. aureus* niż w

przypadku *B. subtilis*, którego wzrost jest hamowany już w stężeniu 2 μ M. Taki kontrast we wrażliwości na anoplinę[2-6] jest spowodowany różnicami w architekturze peptydoglikanu (stopień uporządkowania, gęstość usieciowania, sposób syntezy) między tymi szczepami (223). W skład mureiny wchodzi liniowe łańcuchy disacharydowe (glikanowe) usieciowane peptydowymi łańcuchami bocznymi (224). *S. aureus* posiada krótkie łańcuchy glikanu, średnio 6–18 jednostek disacharydowych (225,226), zaś *B. subtilis* dłuższe, od 50 do nawet 5000 jednostek disacharydowych (226,227). Różnice te wynikają prawdopodobnie z cylindrycznego kształtu *B. subtilis* i idących za tym większych naprężeń na ściany komórki (223,226,227). Krótkie łańcuchy disacharydowe *S. aureus* charakteryzują się wysokim stopniem usieciowania, gdzie połączenia multimeryczne zawierają do 20 peptydów, podczas gdy *B. subtilis* posiada dimeryczne wiązania między peptydami (228). Ponadto, *S. aureus* produkuje duże ilości lizylo-fosfatydyloglicerolu. Ten zmodyfikowany dodatnio naładowaną lizyną fosfolipid zmniejsza wrażliwość bakterii na kationowe peptydy i antybiotyki (229–231).

W literaturze przedstawiono inne pochodzące ze źródeł naturalnych α -helikalne AMP. Są one peptydami kationowymi o charakterze amfipatycznym. Z sukcesem poprawiono ich właściwości przeciwbakteryjne poprzez wprowadzanie węglowodorowych „zszywek”. Dowiedziono, że wyizolowana z żaby koreańskiej eskulentyna-2EM o długości 37 aminokwasów może działać efektywnie przy skróceniu do 15 aminokwasów. Wprowadzenie „zszywek” do skróconego peptydu oraz zmiany w jego sekwencji wykazały wyższą zawartość helisy i silniejszą aktywność przeciwbakteryjną, jak również lepszą oporność proteolityczną. Zaobserwowano nawet 64-krotne zmniejszenie wartości MIC (232). Analogi peptydu polybia-MP1 o długości 14 aminokwasów wyizolowanego z osy *Polybia paulista* wykazały ponad 3-krotnie większą zawartość helisy po wprowadzeniu „zszywek”. Przełożyło się to na około 70 razy lepszą stabilność proteolityczną, do 23-razy większą aktywność przeciwbakteryjną, ale również większą hemolizę zależną od stężenia peptydu (200). Z kolei wyizolowana ze skóry afrykańskiej żaby szponiastej magainina 2 o oryginalnej długości 23 aminokwasów wykazuje działanie przeciwbakteryjne przy skróceniu do 17 reszt. Pochodne skróconej magaininy 2 z wprowadzonymi „zszywkami” skutkowały większą stabilnością oraz do 32-razy niższą wartością MIC. Jednak w większości przypadków wykazały wyższe właściwości hemolityczne (233). Podobnie jak w analogach anopliny (anoplina[5-9]), w powyższych pracach zaobserwowano, że wzrost hydrofobowości peptydu wpływa nie tylko na oczekiwane zwiększenie jego aktywności, głównie przeciw szczepom Gram-dodatnim, ale również na niepożądaną wyższą aktywność hemolityczną. Należy jednak zauważyć, że zbadany w niniejszej pracy „zszyty” analog, anoplina[2-6], nie był ani cytotoksyczny, ani hemolityczny (203). Równocześnie, wykazał niską wartość MIC dla większości szczepów Gram-ujemnych. Badania pochodnych peptydu (KFF)₃K „zszytych” w pozycjach [2–6] i [5–9] (Rysunek 82) przeprowadzone na szczepach *E. coli* i *S. aureus* w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych wykazały 2-krotne, a nawet 16-krotne zmniejszenie wartości MIC peptydu (191). Analog (KFF)₃K[2–6] przejawiał większą aktywność wobec patogennych szczepów zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. „Zszyt” (KFF)₃K, który oryginalnie jest peptydem CPP, inicjuje jego działanie przeciwbakteryjne destabilizując błonę bakteryjną, zgodnie z mechanizmem działania typowego AMP. Wartości MIC obydwu „zszytych” analogów były porównywalne w obrębie danego szczepu. Oznacza to, że decydujące znaczenie miała stabilizacja struktury helikalnej, a nie pozycja „zszywki”. Ponadto, wprowadzenie „zszywek” zwiększyło stabilność peptydu na degradację enzymatyczną, a analogi w stężeniach MIC wykazały niską aktywność hemolityczną. W obydwu przypadkach analog „zszyty” w pozycji [5-9] okazał większą stabilność oraz mniejszy stopień hemolizy niż analog [2-6]. Metoda „zszywania” peptydów umożliwia inicjację właściwości przeciwdrobnoustrojowych peptydów CPP, które mogą wykazywać aktywność antybakteryjną porównywalną do analogów peptydów AMP. W konsekwencji, technika ta znacznie poszerza możliwości projektowania i otrzymywania nowych peptydomimetyków przeciw drobnoustrojom.



Rysunek 82. Reprezentacja α -helis w konfiguracji kołowej i sekwencji zszytych peptydów $(KFF)_3K[2-6]$ i $(KFF)_3K[5-9]$. Zaznaczono pozycje wprowadzonych „zszywek” (S₅). Źródło: (191)

5.5 Podsumowanie części II

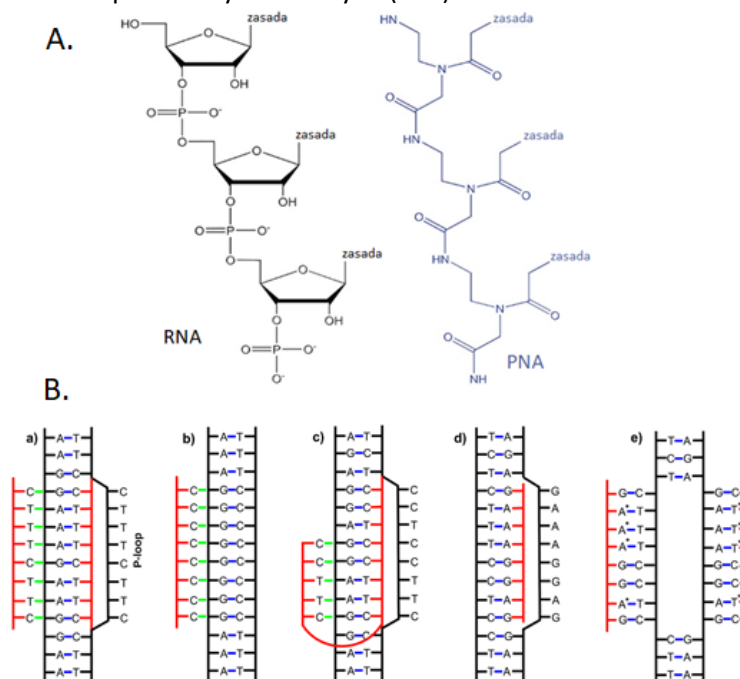
W pracy wykazano, że wprowadzanie węglowodorowych „zszywek” wymusza strukturę helikalną anopliny już w roztworze i poprawia stabilność tej struktury helikalnej w obecności błon biologicznych. Jej zmodyfikowane analogi wykazały działanie zarówno przeciwko szczepom Gram-ujemnym (anoplina[2-6]), jak i szczepom Gram-dodatnim (anoplina[5-9]). Ładunek peptydu oraz charakter podstawionych aminokwasów w zmodyfikowanych pochodnych wpływa na ich aktywność przeciwbakteryjną. Może też wpływać na ich toksyczność względem komórek eukariotycznych, jednak w przypadku anoplina[2-6] takiej cytotoksyczności nie zaobserwowano. Tak więc, sama w sobie stabilizacja struktury helikalnej nie musi zwiększać toksyczności peptydów. W zależności od szczepu, niektóre z analogów anoplina działały lepiej niż antybiotyki tradycyjne. Biorąc pod uwagę fakt, że ampicylina i kanamycyna nie poradziły sobie ze szczepami ESBL+, a polimyksyna B okazała się nieskuteczna wobec szczepu MRSA, modyfikacja struktury peptydów w postaci węglowodorowych zszywek może stanowić interesujący kierunek badań w poszukiwaniu nowych terapii przeciwbakteryjnych.

6 Transport koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z witaminą B₁₂ lub peptydem (KFF)₃K do komórek *Escherichia coli*

6.1 Wstęp

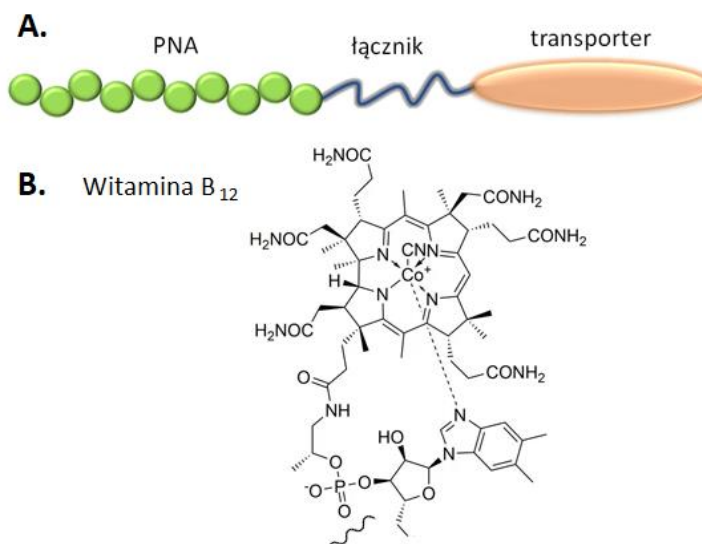
6.1.1 Peptydowy kwas nukleinowy

Peptydowy kwas nukleinowy, PNA (ang. *Peptide Nucleic Acid*) (Rysunek 83A) jest syntetycznym oligonukleotydem zaprojektowanym jako analog DNA i zsyntezowanym po raz pierwszy w 1991 roku przez P. E. Nielsena (234). W przeciwieństwie do naturalnych kwasów nukleinowych jest cząsteczką elektrycznie obojętną. Ujemnie naładowany cukrowo-fosforanowy szkielet naturalnych kwasów nukleinowych został zastąpiony łańcuchem poliamidowym zbudowanym z powtarzających się jednostek N-(2-aminoetylo)glicyny połączonych ze sobą wiązaniem amidowym, a z zasadami przez wiązania karbonylowe metylenu (235). Brak ładunku wpływa na silniejsze wiązanie z DNA lub RNA, które jest możliwe ze względu na posiadanie przez PNA tych samych zasad azotowych (adenina, guanina, tymina, cytozyna). PNA łączy się z komplementarnymi zasadami naturalnych kwasów nukleinowych głównie przez oddziaływania wodorowe Watsona-Cricka w duplekisy oraz trypleksy, w których PNA mogą hybrydizować za pomocą wiązań wodorowych typu Hoogsteena (Rysunek 83B) (236). Dzięki parowaniu zasad oraz neutralnemu ładunkowi łańcucha, PNA wykazuje wysokie powinowactwo i specyficzność do sekwencji docelowej (237). Ponadto, nie występuje odpychanie elektrostatyczne między łańcuchami PNA i łańcuchami naturalnych kwasów nukleinowych. Odpowiada to za wysoką stabilność powstałych kompleksów. PNA może tworzyć kompleksy również z innymi cząsteczkami PNA. Takie hybrydy są stabilniejsze niż kompleksy z DNA czy RNA (238). Zmiany struktury wpłynęły także na odporność na działanie proteaz (239) i nukleaz (240). Dzięki temu, wzrosło zainteresowanie PNA w terapiach antysensownych (237).



Rysunek 83. A. Porównanie struktur PNA i RNA. Źródło: (238) B. Schematy kompleksów PNA z dwuniciowym DNA: a) trypleks z pętlą, b) trypleks, c) klamra, d) dupleks z pętlą, e) podwójny dupleks. Czerwone linie — PNA, czarne linie – DNA, niebieskie linie - wiązania wodorowe typu Watsona – Cricka, zielone linie - wiązania wodorowe typu Hoogsteena, * – zmodyfikowane zasady nukleotydowe. Źródło: (236)

Z drugiej strony, struktura PNA zmniejsza jego rozpuszczalność w wodzie i zwiększa charakter lipofilny powodując agregację cząsteczek w roztworach wodnych (239). Z tego powodu, PNA nie jest w stanie samo efektywnie przedostać się do komórek bakteryjnych (236) i eukariotycznych (241). Oznacza to konieczność zastosowania odpowiednich transporterów (Rysunek 84A). Cząsteczkami wprowadzającymi PNA do wnętrza komórki mogą być np. peptyd (KFF)₃K (141,237,242) wymagający do tego receptora SbmA w błonie wewnętrznej (243) lub witamina B₁₂ (124,142) (Rysunek 84B).



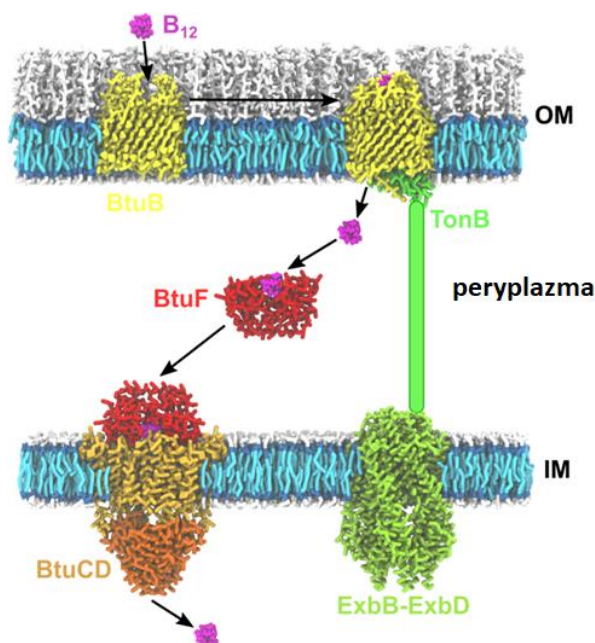
Rysunek 84. A. Schemat PNA związanego z transporterem poprzez łącznik. **B.** Struktura witaminy B₁₂.
Źródło: (124).

6.1.2 Ścieżka transportu witaminy B₁₂ w *Escherichia coli*

Witamina B₁₂ (kobalamina) jest koenzymem pełniącym ważną rolę w organizmach żywych (244). Bierze udział m. in. w reakcjach związanych z przemianami węglowodanów, syntezą kwasów nukleinowych i neuroprzekaźników, tworzeniem czerwonych ciałek krwi oraz funkcjami odpornościowymi (68). Kobalamina jest wykorzystywana przez większość bakterii, ale tylko część z nich ma zdolność jej syntezy. Reszta, w tym *Enterobacteriaceae*, *Bacillus subtilis* oraz *Streptococci* z grupy A, musi pobierać witaminę B₁₂ z zewnątrz (245).

Szlak wychwytu kobalaminy u *E. coli* zachodzi w dwóch etapach (szybka faza początkowa, niewymagająca wkładu energetycznego, oraz następująca po niej faza wolna, zależna od energii pochodzącej z hydrolizy ATP) (246) i jest determinowany przez system transporterów zależnych od białka błony wewnętrznej TonB (247) (Rysunek 85). W pierwszym etapie białko błony zewnętrznej BtuB wiąże witaminę B₁₂ od strony zewnątrzkomórkowej. W celu jej wprowadzenia do przestrzeni peryplazmatycznej, niezbędne jest rozwinięcie domeny luminalnej BtuB w wyniku interakcji z TonB (245,248). Następnie, kobalamina wiąże się z wysokim powinowactwem do białka peryplazmatycznego BtuF pomiędzy jego dwiema domenami (249). Na ułożenie białka BtuF optymalne do wiązania i uwalniania witaminy B₁₂ również wpływa białko TonB (250). Kobalamina związana z BtuF zostaje dalej przyłączona do kompleksu BtuCD umieszczonego w błonie wewnętrznej komórki. Kompleks ten jest tetramerem BtuC2D2 należącym do rodziny transporterów ABC, które wykorzystują energię z hydrolizy ATP do przenoszenia różnych substratów przez błony komórkowe. Tetramer zbudowany jest z dwóch domen transbłonowych BtuC oraz dwóch domen BtuD, które kierują transportem substratu poprzez wiązanie i hydrolizę ATP (251,252). Uważa się, że BtuF wiążący witaminę B₁₂ jest połączony z tetramerem przez cały proces jej transportu. Jeśli BtuF zawiera substrat, BtuCD utrzymuje otwartą i

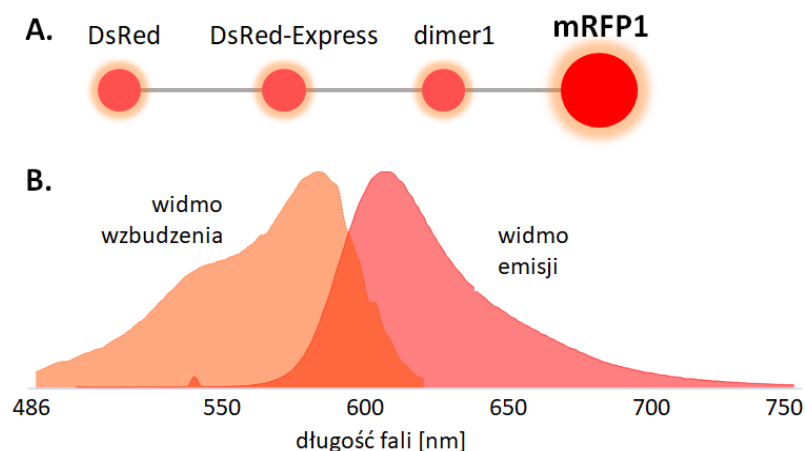
stabilną konformację (253). Po odłączeniu BtuF lub witaminy B₁₂ transporter zamyka się. Wiązanie i hydroliza ATP determinują zmiany konformacyjne na BtuD oraz otwieranie i zamykanie bram peryplazmatycznych i cytoplazmatycznych, co w konsekwencji powoduje przesuwanie kobalaminy do wnętrza komórki (254).



Rysunek 85. Ścieżka transportu witaminy B₁₂ przez zewnętrzną (OM) i wewnętrzną (IM) błonę komórkową *E. coli*. Źródło: (255)

6.1.3 Białko czerwonej fluorescencji

Białko czerwonej fluorescencji, RFP (ang. *Red Fluorescent Protein*) jest pochodną oryginalnego białka DsRed (Rysunek 86A). W przeciwieństwie do tetrameru matczynego, RFP jest monomerem i dojrzewa szybciej wykazując przy tym podobną jasność w żywych komórkach. Dzięki temu, jest szeroko stosowany w badaniach biologicznych, m.in. do monitorowania procesów fizjologicznych. Odbywa się to poprzez pomiar intensywności światła emitowanego na drodze fluorescencji. Białko RFP kodowane jest przez gen reporterowy *mrfp1* (ang. *monomeric red fluorescent protein*) (256). Na Rysunku 86B przedstawiono pełny zakres widma wzbudzenia i widma emisji RFP.



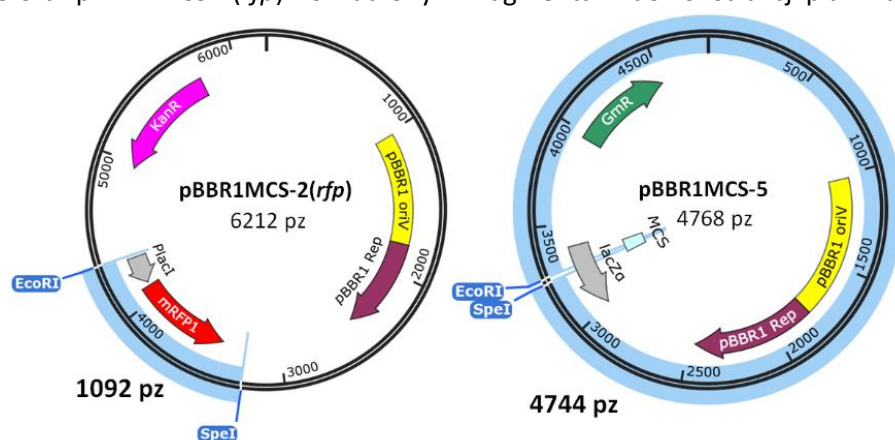
Rysunek 86. A. Ewolucja monomeru mRFP1 z tetrameru matczynego DsRed. B. Widma wzbudzenia i emisji białka czerwonej fluorescencji (RFP). Źródło: www.fpbases.org/protein/mrfp

6.2 Materiały i metody

6.2.1 Konstrukcja plazmidu z genem *mrfp1* i opornością na gentamycynę

Wybór fragmentów DNA do konstrukcji plazmidu

Wykorzystane w badaniach mutanty *E. coli* posiadają w swoim genomie gen oporności na kanamycynę, dlatego nie można było użyć plazmidu pBBR1MCS-2 z genem białka czerwonej fluorescencji *mrfp1* przygotowanego wcześniej w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych (124). Do konstrukcji nowego plazmidu jako plazmid bazowy, wybrano pBBR1MCS-5 z tym samym miejscem inicjacji replikacji - *ori* pBBR1 - lecz z genem oporności na gentamycynę. Plazmid pBBR1MCS-2(*rfp*) posłużył jako źródło genu *mrfp1*. Sekwencje i możliwość ligacji obydwu fragmentów plazmidowego DNA sprawdzono w programie SnapGene Viewer. Na Rysunku 87 przedstawiono mapy plazmidów pBBR1MCS-5 oraz pBBR1MCS-2(*rfp*) z oznaczonymi fragmentami do konstrukcji plazmidu końcowego.



Rysunek 87. Schematy plazmidów pBBR1MCS-2(*rfp*) i pBBR1MCS-5. Niebieskie okręgi pomiędzy miejscami restrykcyjnymi SpeI i EcoRI i oznaczoną długością par zasad (pz) obejmują fragmenty do skonstruowania pBBR1MCS-5(*rfp*). KanR – gen oporności na kanamycynę, GmR – gen oporności na gentamycynę, mRFP1 – gen białka czerwonej fluorescencji (RFP), pBBR1 oriV – początek replikacji plazmidu pBBR1 o szerokim zakresie gospodarza, pBBR1 Rep – białko wymagane do replikacji plazmidu, PlacI – promotor operonu laktozy, MCS – miejsce wielokrotnego klonowania, w które można wprowadzić inny gen (np. *mrfp1*), *lacZα* – gen enzymu β -galaktozydazy. Mapy plazmidów wizualizowano w przeglądarce SnapGene Viewer.

Izolacja i trawienie plazmidów

Za pomocą zestawu GeneElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) wyizolowano plazmid pBBR1MCS-5 z *E. coli* S17 oraz pBBR1MCS-2(*rfp*) z *E. coli* K-12 MG1655(*rfp*) dostępnych w banku bakterii Laboratorium Maszyn Biomolekularnych. Plazmidy zostały strawione enzymami restrykcyjnymi Fast Digest: EcoRI, SpeI (ThermoFisher Scientific) według protokołów dołączonych do zestawów.

Elektroforeza pozioma do rozdzielu cząsteczek DNA

Przygotowano wyjściowy bufor 10xTAE (x40 mM Tris (Tris(hydroksymetylo)aminometan, Merck), x20 mM kwas octowy, x1 mM EDTA; pH 8). Bufor rozcieńczono do 1xTAE i użyto do wykonywania żeli agarozowych (Agaroz, Sigma-Aldrich). DNA plazmidowe strawione enzymami restrykcyjnymi zostało obciążone dedykowanym buforem Fast Digest Green (ThermoFisher Scientific).

Do sprawdzenia wielkości strawionych fragmentów DNA wykorzystano marker DNA 1 kb Plus DNA (New England BioLabs) oraz marker DNA 1 kb GeneRuler (ThermoFisher Scientific). Elektroforezę prowadzono przez 30-40 minut w buforze 1xTAE przy 85 V.

Izolacja DNA z żelu agarozowego

W celu sprawdzenia i archiwizacji wyniku trawienia enzymatycznego plazmidowego DNA wykonano zdjęcie żelu pod światłem UV systemem do wizualizacji, dokumentacji i analizy kwasów nukleinowych Molecular Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad) przy użyciu oprogramowania Image Lab (Bio-Rad). Następnie, podświetlono żel na transiluminatorze UV (CSLUVTSDUO312, Cleaver Scientific Ltd.) przy długości fali 312 nm i wycięto odpowiednie fragmenty DNA plazmidowego. Za pomocą zestawu do oczyszczania DNA z agarozy – GeneMATRIX Agarose Out DNA Purification Kit (EURx) wyizolowano DNA z żelu.

Plazmid końcowy

Oczyszczone fragmenty DNA plazmidowego, tj. bazy plazmidu pBBR1MCS-5 z opornością na gentamycynę oraz genu białka czerwonej fluorescencji *mrfp1* zligowano za pomocą ligazy T4 DNA (ThermoFisher Scientific) według dedykowanego protokołu.

6.2.2 Transformacja plazmidu do bakterii pomocniczych

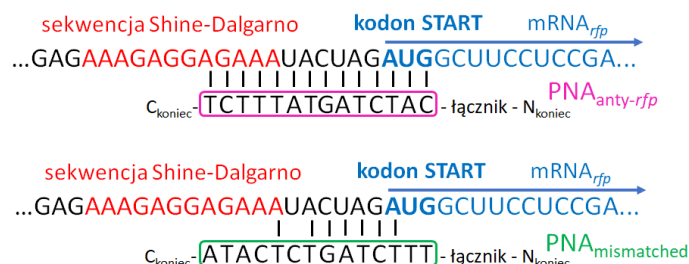
Początkowo, szczep dziki *E. coli* K-12 MG1655 (125) został wykorzystany jako bakterie pomocnicze pierwszego biorcy skonstruowanego plazmidu. Szczep ten był dostępny w banku bakterii Laboratorium Maszyn Biomolekularnych. Przygotowanie komórek kompetentnych szczepu dzikiego oraz ich transformację plazmidem pBBR1MCS-5(*rfp*) przeprowadzono przy użyciu zestawu do przygotowywania i transformacji komórek kompetentnych *Escherichia coli* - *E. coli* Transformer Kit (A&A Biotechnology).

6.2.3 Weryfikacja skonstruowanego plazmidu

Jedną z kolonii bakterii wyrosłych na szalkach LA (LB agar, Biocorp) z 20 µg/ml gentamycyną (Sigma-Aldrich) zaszczepiono do hodowli nocnej LB (Biocorp) z gentamycyną, a następnie wyizolowano plazmid według protokołu GeneElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Wyizolowany plazmid został ponownie strawiony enzymami restrykcyjnymi. Wykonano trawienie podwójne, enzymami EcoRI i SpeI, oraz pojedyncze, tylko enzymem EcoRI. Trawienie jednym enzymem przeprowadzono w celu potwierdzenia wielkości plazmidu, a trawienie dwoma, aby potwierdzić obecność wstawki z genem *mrfp1*. Wyniki trawienia sprawdzono na 1% żelu agarozowym.

6.2.4 Koniugaty PNA z witaminą B₁₂ lub peptydem (KFF)₃K

Koniugaty PNA z witaminą B₁₂ lub z peptydem (KFF)₃K (Tabela 18) zostały zsyntezowane manualnie i dostarczone przez dra Tomasza Pieńko z Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, Centrum Nowych Technologii UW. PNA_{anty-rfp}, jak i PNA_{scrambled} celują w ten sam fragment mRNA genu *mrfp1*. Sekwencja PNA_{scrambled} została zmieniona w stosunku do sekwencji wyjściowej PNA_{anty-rfp} (Tabela 18), by jako kontrola słabiej oddziaływać z miejscem docelowym, a więc słabiej wyciszać fluorescencję białka RFP. PNA_{scrambled} tworzy 50% wiązań typu Watsona-Cricka z fragmentem docelowym w porównaniu z PNA_{anty-rfp} (Rysunek 88).



Rysunek 88. A. Miejsce docelowe na sekwencji mRNA_{rpf} przyłączenia zaprojektowanych PNA. **B.** Koniugaty PNA połączone z: witaminą B₁₂ za pomocą łańcucha węglowodorowego (CH₂)₁₂; peptydem (KFF)₃K za pomocą glikolu polietylenowego, eg1 (ang. *Ethylene Glycol*).

Tabela 18. Sekwencja RNA docelowego oraz użytych PNA z koniugatami z witaminą B₁₂ i peptydem (KFF)₃K. (CH₂)₁₂ – łącznik PNA z witaminą B₁₂, eg1 – łącznik PNA z peptydem (KFF)₃K.

Nazwa	Sekwencja
PNA	
PNA _{anty-rfp}	N _{koniec} -CATCTAGTATTTCT-C _{koniec}
PNA _{mismatched}	N _{koniec} -TTTCTAGTCTCATA-C _{koniec}
Peptyd	
(KFF) ₃ K	N _{koniec} -KFFKFFKFFK-C _{koniec}
Koniugaty PNA z (KFF)₃K	
(KFF) ₃ K-PNA _{anty-rfp}	N _{koniec} -KFFKFFKFFK-eg1-CATCTAGTATTTCT-C _{koniec}
(KFF) ₃ K-PNA _{mismatched}	N _{koniec} -KFFKFFKFFK-eg1-TTTCTAGTCTCATA-C _{koniec}
Koniugaty PNA z witaminą B₁₂	
B ₁₂ -PNA _{anty-rfp}	B ₁₂ -(CH ₂) ₁₂ -CATCTAGTATTTCT-C _{koniec}
B ₁₂ -PNA _{mismatched}	B ₁₂ -(CH ₂) ₁₂ -TTTCTAGTCTCATA-C _{koniec}

6.2.5 Szczepy bakterii

Szczepem kontrolnym przeprowadzonych badań jest szczep dziki *E. coli* K-12 MG1655. Badane mutanty *E. coli* pochodzą z kolekcji Keio, CGSC (ang. *Coli Genetic Stock Center*) z banku bakterii dostępnych na Uniwersytecie Yale w USA. Szczepy posiadające mutacje genów kodujących białka transportowe (Rysunek 85) przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Szczepy *Escherichia coli* badane w transporcie koniugatów PNA.

Szczep <i>E. coli</i> (gen delecji)	Charakterystyka
K-12 MG1655 (125)	Szczep laboratoryjny <i>Escherichia coli</i> typu dzikiego.
JW1701-1 (Δ btuC) (251)	Brak BtuC – białko permeazy układu transportu witaminy B ₁₂ . Transmembranowa składowa kompleksu BtuC2D2, odpowiedzialna za przenoszenie substratu przez błonę wewnętrzną
JW1699-1 (Δ btuD) (251)	Brak BtuD – białko wiążące ATP, system transportu witaminy B ₁₂ . Odpowiedzialne za sprzężenie energii ATP z systemem transportowym.
JW0154-1 (Δ btuF) (249)	Brak BtuF – białko wiążące witaminę B ₁₂ . Dostarcza witaminę B ₁₂ na peryplazmatyczną powierzchnię BtuC.
JW0368-1 (Δ sbmA) (257)	Brak SbmA – białko transportujące w błonie wewnętrznej. Odpowiada za wchłanianie peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

6.2.6 Przygotowywanie i transformacja komórek kompetentnych

Proces otrzymania komórek kompetentnych badanych szczepów oraz ich transformacja plazmidem pBBR1MCS-5(*rfp*) zostały przeprowadzone przy użyciu zestawu do przygotowywania i transformacji komórek kompetentnych *Escherichia coli* - *E. coli* Transformer Kit (A&A Biotechnology).

6.2.7 Przygotowanie komórek do banku bakterii

Z każdej szalki z wyrosłymi transformantami pięciu szczepów *E. coli* wybrano po jednej kolonii i zaszczerpiono do oddzielnych hodowli w pożywce LB (Biocorp) z gentamycyną (Sigma Aldrich). Nocną hodowlę prowadzono w termomikserze w 37°C z wytrząsaniem 600 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf). Następnego dnia każdą hodowlę bakterii rozcieńczono z 50% glicerolem (POCH) w stosunku objętościowym 1:1 i dokładnie wymieszano przez worteksowanie. Tak przygotowane transformanty zamrożono w temperaturze -80°C w banku bakterii Laboratorium Maszyn Biomolekularnych.

6.2.8 Hodowla bakterii

E. coli K-12 MG1655 oraz cztery mutanty zawierające plazmid pBBR1MCS-5(*rfp*) zostały wysiane z banku bakterii na szalki z pożywką minimalną Davisa (sole Davisa (Sigma Aldrich), 0.4% D-(+)-glukoza (Sigma Aldrich), 20 µg/µl gentamycyna, 1.5% (w/v) agar (Sigma Aldrich) - podano stężenia końcowe). Szalki inkubowano przez noc w cieplarni w 37°C. Następnego dnia, zaszczerpiono po jednej kolonii bakterii do 2 mL płynnej pożywki Davisa. Inkubację prowadzono w termomikserze (Thermomixer comfort, Eppendorf) przez noc w 37°C z wytrząsaniem 600 rpm. Kolejnego dnia odświeżono hodowlę bakterii w 100-krotnym rozcieńczeniu w pożywce Davisa z 0.4% glukozą i wytrząsano przy 600 rpm w 37°C z do osiągnięcia wzrostu logarytmicznego OD₆₀₀: 0.2-0.3.

6.2.9 Przygotowanie rozcieńczeń na mikropłytkę

Rozcieńczenia PNA i jego koniugatów wykonano w 96-dołkowych czarnych mikropłytkach z płaskim dnem optycznym typu F (PureGrand BRAND) w pożywce Davisa metodą rozcieńczeń seryjnych ze standardami CLSI według metody M07-A10 (49). Wartości stężeń wszystkich badanych w pracy związków podano w µMol (µM).

Bakterie z odświeżonej hodowli rozcieńczono do ~5 x 10⁵ CFU/ml. Ze względu na bardzo wolny wzrost mutantu *ΔbtuD* w porównaniu do reszty dodano 10x objętościowo więcej bakterii do rozcieńczeń przygotowanych do nałożenia na mikropłytkę, by zaobserwować jakikolwiek efekt od badanych związków. Końcowa objętość badanych związków i wszystkich szczepów bakterii w każdym dołku wynosiła 100 µl. Stężenia badanych związków wynosiły 0.5, 1, 2, 4, 8 i 16 µM. Zmierzono również wzrost bakterii bez dodatku związku jako kontrolę wzrostu oraz sprawdzono samą pożywkę pod względem czystości. Stanowiła ona kontrolę sterylności i tło odejmowane od hodowli bakterii przy późniejszej analizie wyników. Płytkę zaklejono od góry sterylną folią aluminiową, zaś od dołu czarną uszczelniającą naklejką umożliwiającą pomiar fluorescencji. Przeprowadzono co najmniej dwa powtórzenia biologiczne, dla każdego związku i szczepu, zawierające po trzy powtórzenia techniczne.

6.2.10 Monitorowanie transportu PNA komórek bakteryjnych oraz poziomu intensywności białka czerwonej fluorescencji (RFP)

Mikro płytki wytrząsano przy 165 rpm przez 20 h w dużym inkubatorze (Incubator Shaker Series, Innova 44) w 37°C. Po tym czasie zmierzono fluorescencję emitowaną przez białko RFP przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 584$ nm i fali emisji $\lambda = 610$ nm oraz absorbancję hodowli przy długości fali $\lambda = 600$ nm używając czytnika mikroplatek Microplate Biotek Synergy H1 i oprogramowania Gen5 (BioTek).

6.2.11 Badanie temperatur topnienia koniugatów PNA z witaminą B₁₂ i peptydem (KFF)₃K

Oligonukleotyd RNA_{rfp} 5' – AGAAAUACUAGAUG – 3' o sekwencji docelowej i 100% komplementarnej dla PNA_{anty-rfp} zamówiono w firmie Future Synthesis (Polska, Poznań). RNA rozcieńczono w wodzie MQ zgodnie z zaleceniami producenta. Mierzone stężenia RNA i PNA w ekseprymencie temperatur topnienia badanych kompleksów wynosiły 2 μ M. Oligonukleotydy mieszało w 10 mM buforze fosforanowym (firma), pH 7.0, 20 mM NaCl (Sigma Aldrich) w kuwetach kwarcowych. Obok kuwety z badanym kompleksem znajdowała się kuweta referencyjna zawierająca czysty bufor. Próbkę podgrzewano z prędkością 1°C/min w zakresie od 10°C do 90°C. W ramach pomiaru jednego kompleksu przeprowadzono po 10 powtórzeń podgrzewania i oziębiania próbek. Pomiary prowadzono przy długości fali 260 nm za pomocą spektrofotometru UV-VIS Evolution 300 (Thermo Scientific) i termostatu Peltiera (Model 1 Cell Peltier/ Smart Peltier Thermostatted Single Cell Holder, Thermo Scientific) w programie VISIONpro (Thermo Scientific).

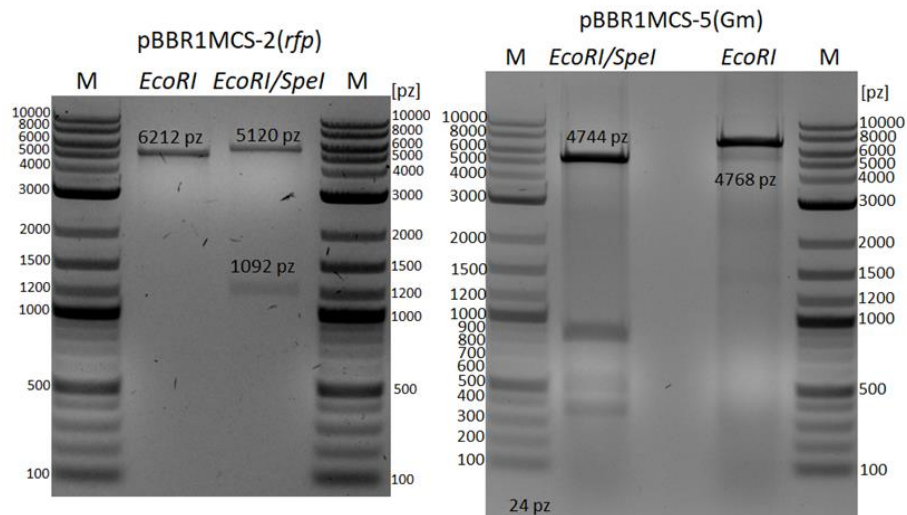
6.2.12 Analiza statystyczna

Analizę wyników otrzymanych intensywności fluorescencji i absorbancji oraz temperatur topnienia przeprowadzono w programie Microsoft Excel. Znormalizowano kontrole wzrostu fluorescencji. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA oraz wykresy wykonano w programie GraphPad 6 Prism. Obliczenia temperatur topnienia zostały przeprowadzone metodą regresji liniowej w programie VISIONpro. Temperatury normalizowano względem absorbancji w temperaturze 90°C. Reprezentatywne krzywe temperatur topnienia dla każdego kompleksu wygładzono metodą Savitsky'ego-Golaya (wygładzanie drugiego rzędu, 30 sąsiadów) i zwizualizowano w programie GraphPad 7 Prism.

6.3 Wyniki

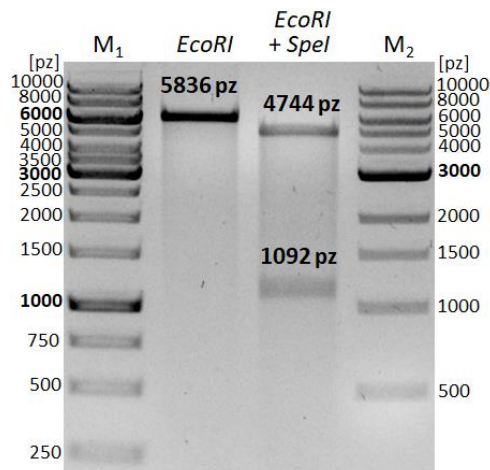
6.3.1 Plazmid z genem białka czerwonej fluorescencji *mrfp1*

Po trawieniu plazmidu pBBR1MCS-5 jednym enzymem restrykcyjnym oczekiwano fragmentu o długości 4768 par zasad (pz), a dwoma enzymami fragmentów o długościach 4744 i 24 pz. Natomiast po trawieniu plazmidu pBBR1MCS-2(*rfp*) jednym enzymem fragmentu o długości 6212 pz, zaś dwoma - 5120 i 1092 pz. Plazmid pBBR1MCS-5 trawiony jednym enzymem (EcoRI) powinien dać tylko jeden prążek (4768 pz), natomiast dwoma (EcoRI i SpeI), dwa prążki: pożądany o długości 4744 pz i drugi, niewidoczny na żelu ze względu na swoją niską masę, o długości 24 pz. Na Rysunku 89 przedstawiono fragmenty plazmidów po trawieniach enzymami restrykcyjnymi. Trzy dodatkowe prążki o długości około 350, 500 i 850 pz po podwójnym trawieniu plazmidu pBBR1MCS-5 są nieoczekiwane, ale nie uniemożliwiają izolacji odpowiedniego prążka (4744 pz) i przeprowadzenia dalszych eksperymentów. Po trawieniu jednym enzymem również pojawiają się dodatkowe, nieoczekiwane, mniej widoczne prążki, które również nie zakłócają realizacji zaplanowanych badań.



Rysunek 89. Weryfikacja pożądaných fragmentów DNA do skonstruowania plazmidu pBBR1MCS-5(rfp) poprzez analizę trawienia restrykcyjnego. M – marker 1kb Plus DNA Quick Load Ladder (New England BioLabs).

Odpowiednie fragmenty DNA wyizolowano z żelu i zligowano. Po przeprowadzeniu transformacji do bakterii pomocniczych, a następnie izolacji wtransformowanego plazmidu, ponownie strawiono go enzymami restrykcyjnymi. Wizualizacja strawionego DNA na żelu (Rysunek 90) wykazała, że z powodzeniem otrzymano plazmid pBBR1MCS-5(rfp).



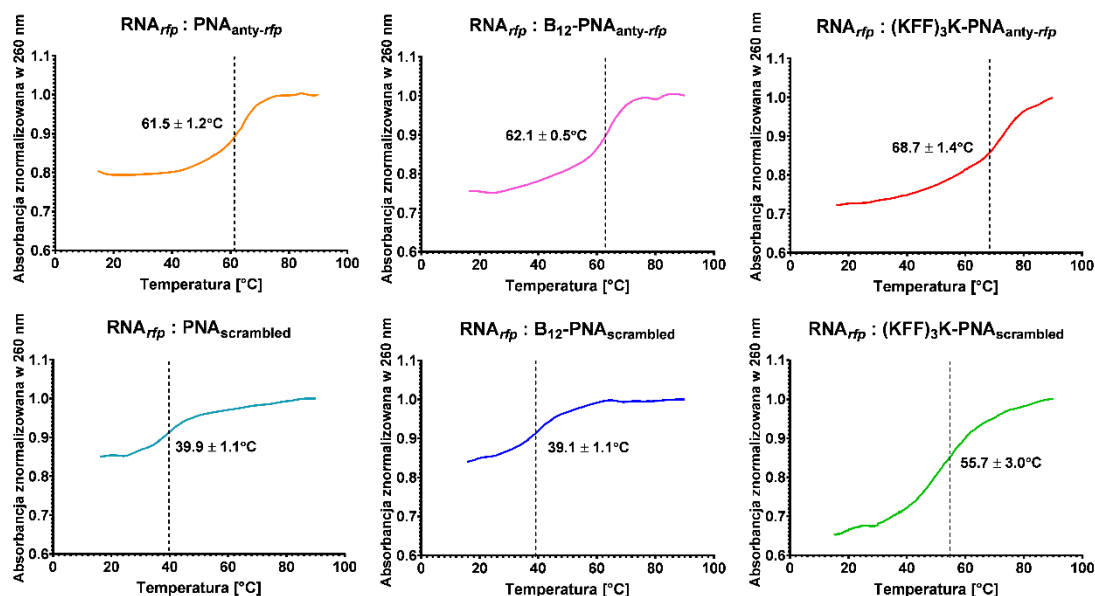
Rysunek 90. Rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA plazmidu pBBR1MCS-5(rfp) po trawieniu jednym (EcoRI) oraz dwoma (EcoRI, SpeI) enzymami restrykcyjnymi. M₁ – marker DNA 1 kb GeneRuler (ThermoFisher Scientific), M₂ – marker DNA 1kb Plus Quick Load (New England BioLabs).

6.3.2 Temperatury topnienia PNA i ich koniugatów z witaminą B₁₂ i peptydem (KFF)₃K

Sekwencja PNA_{anty-rfp} powinna utworzyć 14 sąsiadujących ze sobą wiązań typu Watsona-Cricka z docelowym fragmentem mRNA_{rfp}. Z kolei PNA_{scrambled}, 7 wiązań, z których 6 występuje bezpośrednio po sobie. Na Rysunku 91 przedstawiono krzywe reprezentatywne stabilności termicznej kompleksów *in vitro*. Krzywe posiadają sigmoidalny kształt, co wskazuje na powstawanie i topnienie dupleksów. Wyniki pomiarów temperatur topnienia (Tabela 20, Rysunek 91) wykazały większą wartość dla kompleksów RNA_{rfp} zawierających PNA_{anty-rfp} w porównaniu do kompleksów z PNA_{scrambled}. Tendencja dotyczy kompleksów z wolnymi PNA, jak również z ich koniugatami. Temperatury topnienia dla PNA występujących samodzielnie oraz ich koniugatów z witaminą B₁₂ są porównywalne. Wynoszą około 60°C dla dupleksów z PNA_{anty-rfp} oraz około 40°C dla dupleksów z PNA_{scrambled}. Przyłączenie z peptydu (KFF)₃K do PNA wyraźnie zwiększyło stabilność dupleksów. Wartości temperatur topnienia koniugatów PNA z (KFF)₃K są wyższe od odpowiadających wartości koniugatów PNA z witaminą B₁₂ o około 7°C dla PNA_{anty-rfp} i 17°C dla PNA_{scrambled}. Temperatury topnienia dupleksów potwierdziły, że po wprowadzeniu do komórki PNA_{anty-rfp} powinno skutecznie blokować komplementarne mRNA i wyciszać fluorescencję. Nośnik peptydowy dodatkowo zwiększał temperatury topnienia PNA w koniugacie w porównaniu z wolnym PNA.

Tabela 20. Temperatury topnienia PNA i ich koniugatów z witaminą B₁₂ lub peptydem (KFF)₃K.

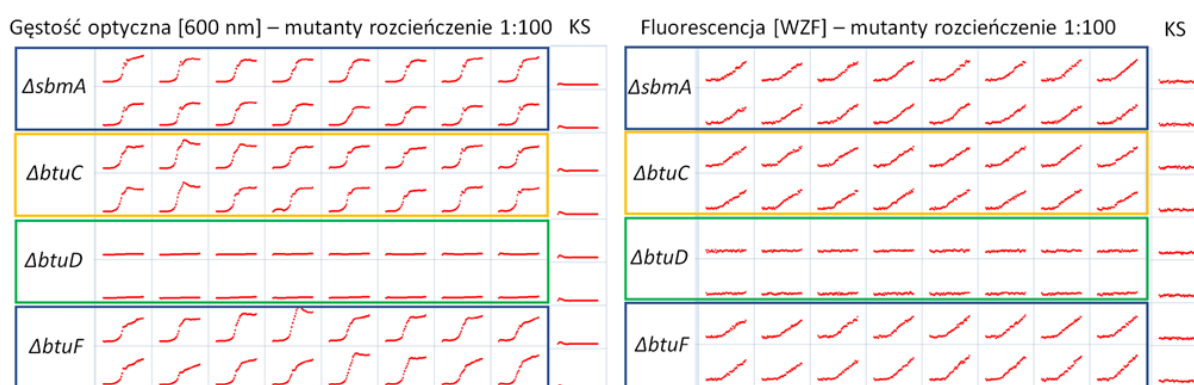
Kompleks RNA _{rfp} z:	Średnia ± odchylenie standardowe
PNA _{anty-rfp}	61,5°C ± 1,2°C
PNA _{scrambled}	39,9°C ± 1,1°C
B ₁₂ -PNA _{anty-rfp}	62,1°C ± 0,5°C
B ₁₂ -PNA _{scrambled}	39,1°C ± 1,1°C
(KFF) ₃ K-PNA _{anty-rfp}	68,7°C ± 1,4°C
(KFF) ₃ K-PNA _{scrambled}	55,7°C ± 3,8°C



Rysunek 91. Krzywe reprezentatywne dla kompleksów RNA_{rfp} z PNA i ich koniugatami. Linia przerywana wskazuje średnią temperaturę topnienia dupleksu.

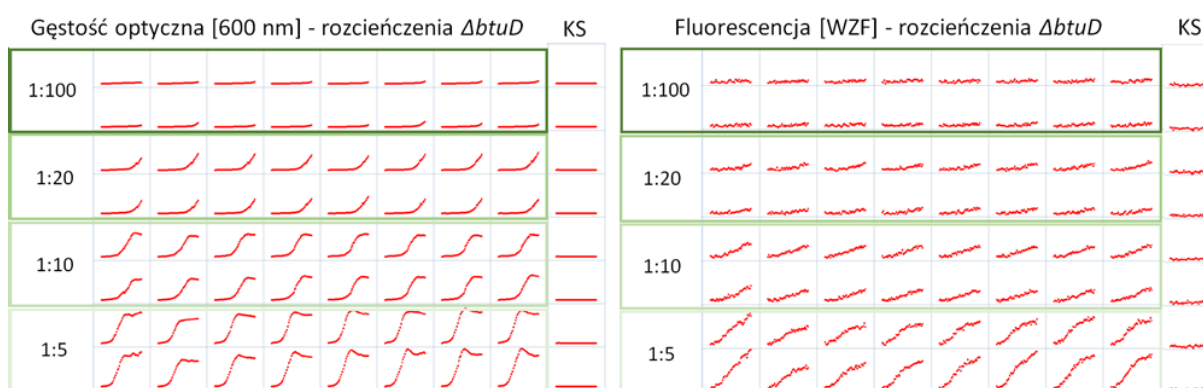
6.3.3 Wzrost mutantów i fluorescencja RFP

Przed zbadaniem wpływu koniugatów PNA z transporterami na wygaszanie RFP sprawdzono wzrost mutantów w pożywce minimalnej Davisa (140), w której bakterie chętnie pobierają witaminę B₁₂ oraz intensywność emitowanej przez nich fluorescencji RFP w czasie 19 godzin (Rysunek 92). Mutanty $\Delta sbmA$, $\Delta btuC$ i $\Delta btuF$ wykazały nie tylko dobry wzrost w tym środowisku, ale również wystarczająco mierzalny poziom fluorescencji. W przypadku mutantu $\Delta btuD$ nie zaobserwowano wzrostu w zastosowanych warunkach.



Rysunek 92. Gęstość optyczna i fluorescencja RFP w czasie 19 godzin hodowli mutantów *E. coli* w minimalnym podłożu Davisa. KS – kontrola sterylności, WZF – względne jednostki fluorescencji. Pokazano 16 niezależnych powtórzeń każdego mutantu (dane surowe).

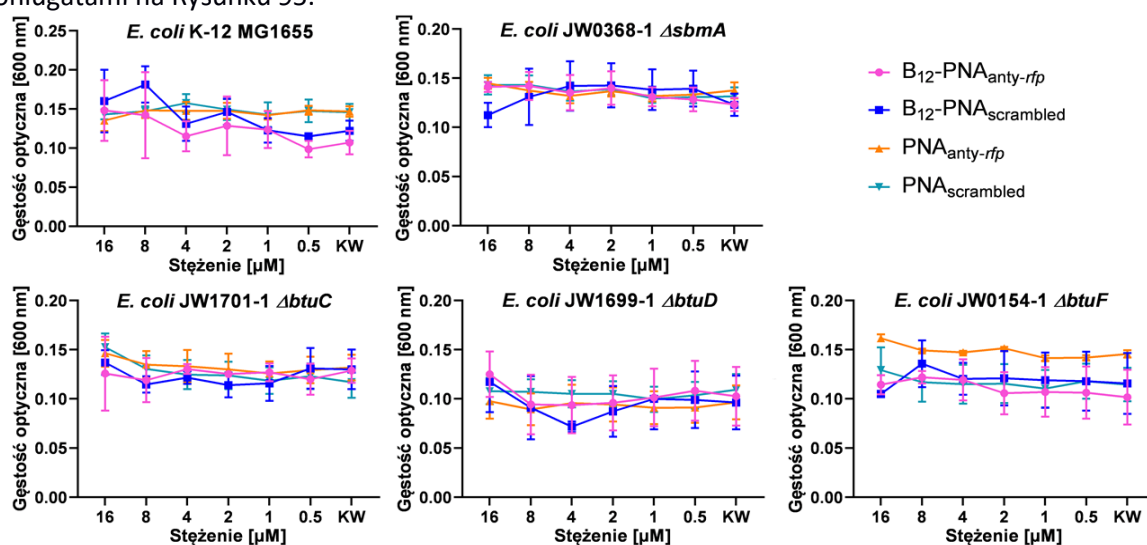
W związku z tym, sprawdzono trzy inne rozcieńczenia mutantu $\Delta btuD$ (Rysunek 93). Poszukiwano takiego rozcieńczenia, które byłoby jak najbliższe rozcieńczeniu pierwotnemu (1:100), ale równocześnie takiego, aby zaobserwować wzrost bakterii i poziom fluorescencji RFP zbliżony do reszty mutantów. Z otrzymanych wyników wybrano rozcieńczenie 1:10 i wykorzystano je do dalszych badań.



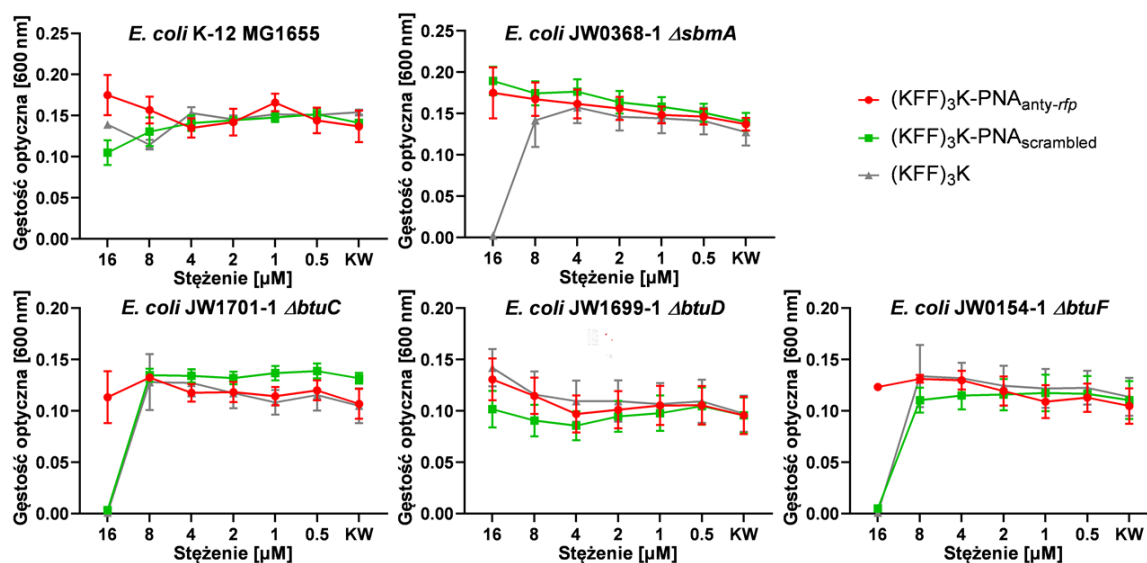
Rysunek 93. Gęstość optyczna i fluorescencja RFP w czasie 19 godzin hodowli mutantu $\Delta btuD$ w minimalnym podłożu Davisa. KS – kontrola sterylności, WZF – względne jednostki fluorescencji. Pokazano 16 niezależnych powtórzeń z każdego rozcieńczenia (dane surowe).

6.3.4 Wzrost bakterii w środowisku PNA i jego koniugatów nośnikami

Po potwierdzeniu tworzenia się dupleksów PNA z RNA *in vitro* i braku negatywnego wpływu nośników na ich tworzenie, sprawdzono czy wzrost bakterii nie jest hamowany przez wybrane związki (Tabela 18). Dokonano pomiarów gęstości optycznej wszystkich szczepów w sześciu stężeniach (0,5, 1, 2, 4, 8 i 16 μM) każdego PNA i koniugatu. Mutanty $\Delta btuC$, $\Delta btuD$ oraz $\Delta btuF$ wykazują wzrost na poziomie 0.10-0.15 gęstości optycznej, natomiast mutant $\Delta sbmA$ i szczep dziki K-12 MG1655 między 0.1, a 0.2. Koniugaty PNA z witaminą B₁₂ nie hamowały wzrostu bakterii w żadnym ze stężeń. Mutanty $\Delta btuC$ i $\Delta btuF$ wykazały zahamowanie wzrostu przy stężeniu 16 μM peptydu (KFF)₃K oraz koniugatu (KFF)₃K-PNA_{scrambled}. Mutant $\Delta sbmA$ przestał rosnąć przy stężeniu 16 μM (KFF)₃K. Z tego powodu, pomiary fluorescencji dla tych szczepów uwzględniono odpowiednio do 8 μM peptydu (KFF)₃K i 8 μM koniugatu (KFF)₃K-PNA_{scrambled}. W przypadku szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta btuD$ nie zaobserwowano zahamowania wzrostu w żadnym ze stężeń badanego związku. Wzrost bakterii z kontrolnymi PNA i koniugatami PNA z witaminą B₁₂ pokazano na Rysunku 94, a z peptydem kontrolnym (KFF)₃K i jego koniugatami na Rysunku 95.



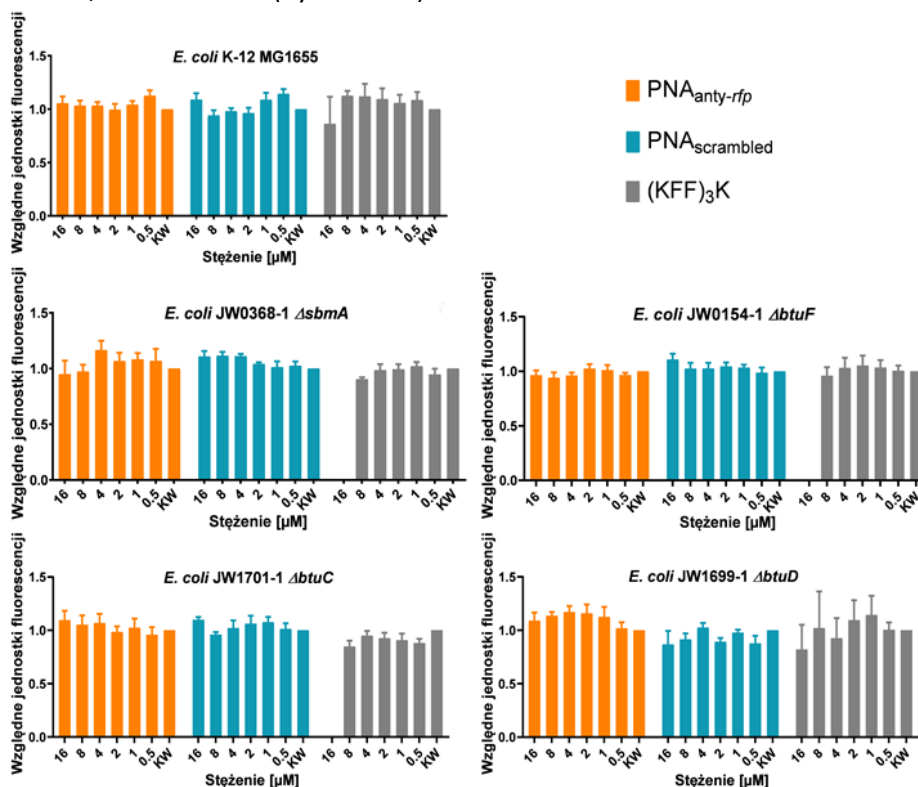
Rysunek 94. Gęstość optyczna bakterii w zależności od stężenia PNA i ich koniugatów z witaminą B₁₂ dla szczepu dzikiego *E. coli* K-12 MG1655 i jego czterech mutantów ($\Delta sbmA$, $\Delta btuC$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuF$).



Rysunek 95. Gęstość optyczna bakterii w zależności od stężenia peptydu (KFF)₃K i jego koniugatów z PNA dla szczepu dzikiego *E. coli* K-12 MG1655 i jego czterech mutantów ($\Delta sbmA$, $\Delta btuC$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuF$).

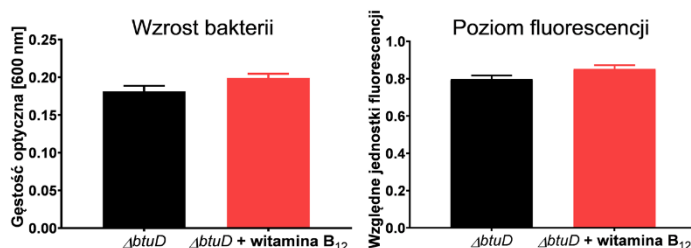
6.3.5 Poziom fluorescencji białka RFP uzyskanych transformantów w środowisku PNA i jego koniugatów z peptydem (KFF)₃K i witaminą B₁₂

Związki kontrolne, tj. PNA_{anty-rfp}, PNA_{scrambled} oraz (KFF)₃K, nie spowodowały wyciszenia poziomu fluorescencji RFP w żadnym ze szczepów (Rysunek 96). Całkowity brak fluorescencji w obecności (KFF)₃K w stężeniu 16 μM występuje wyłącznie w przypadku zupełnego zahamowania wzrostu mutantów: $\Delta sbmA$, $\Delta btuF$ i $\Delta btuC$ (Rysunek 95).



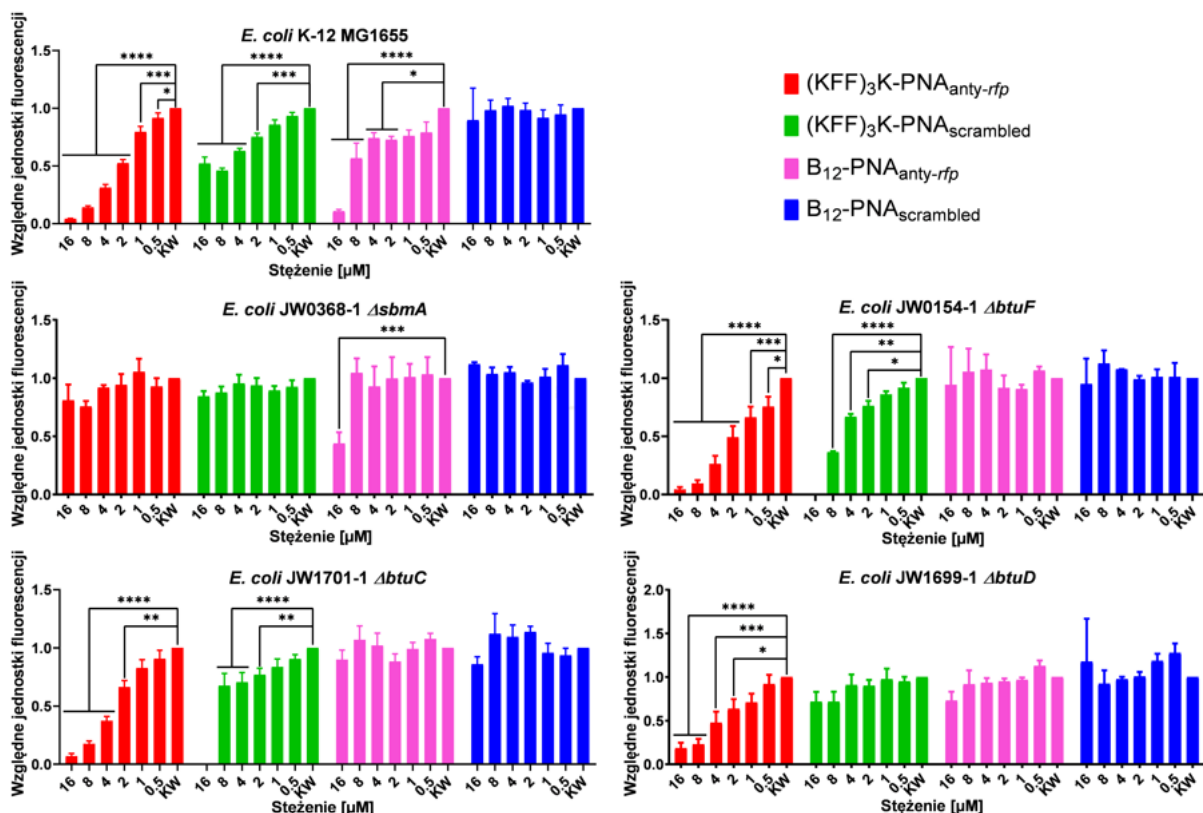
Rysunek 96. Porównanie wpływu kontrolnych PNA i peptydu (KFF)₃K na wygaszanie fluorescencji RFP szczepu dzikiego *E. coli* K-12 MG1655 i jego czterech mutantów ($\Delta sbmA$, $\Delta btuF$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuC$). Słupki błędów przedstawiają SEM z co najmniej dwóch biologicznie niezależnych eksperymentów. Nie ma znaczących różnic we fluorescencji pomiędzy komórkami *E. coli* traktowanymi kontrolnym PNA lub peptydem kontrolnym (KFF)₃K, a kontrolą wzrostu (KW).

Podobnie do związków kontrolnych, sama witamina B₁₂ również nie hamuje wzrostu bakterii, ani nie powoduje spadku fluorescencji RFP. Dotyczy to także słabo rosnącego mutantu $\Delta btuD$ (Rysunek 97).



Rysunek 97. Wzrost mutantu $\Delta btuD$ inkubowanego lub nie z witaminą B₁₂ przez 19 godzin w minimalnej pożywce Davisa. Wyniki wzrostu bakterii i poziomu fluorescencji pochodzą z ostatniej godziny inkubacji. Słupki błędów przedstawiają SEM, n = 19-22. Wyniki hodowli w obecności lub braku witaminy B₁₂ nie są względem siebie istotne statystycznie.

Koniugaty PNA z peptydem (KFF)₃K zmniejszają fluorescencję RFP wraz ze wzrastającym stężeniem we wszystkich szczepach oprócz mutantu $\Delta sbmA$ (Rysunek 98). Związanie RNA_{rfp} z koniugatem (KFF)₃K-PNA_{scrambled} powoduje słabsze wyciszenie fluorescencji niż w przypadku koniugatu (KFF)₃K-PNA_{anty-rfp}. Koniugaty PNA z witaminą B₁₂ nie wykazują zmniejszenia fluorescencji RFP dla mutantów $\Delta btuC$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuF$. W przypadku szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta sbmA$ zaobserwowano częściowe wyciszenie fluorescencji RFP podczas inkubacji bakterii z koniugatem B₁₂-PNA_{anty-rfp}. Największe wygaszenie fluorescencji występuje po inkubacji z koniugatem w stężeniu 16 μ M i jest silniejsze dla szczepu K-12 niż dla mutantu $\Delta sbmA$. Koniugat B₁₂-PNA_{scrambled} nie wykazuje spadku fluorescencji RFP w żadnym ze szczepów.



Rysunek 98. Porównanie wpływu koniugatów PNA z witaminą B₁₂ i peptydem (KFF)₃K na wygaszanie fluorescencji RFP szczepu dzikiego *E. coli* K-12 MG1655 i jego czterech mutantów ($\Delta sbmA$, $\Delta btuF$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuC$). Słupki błędów przedstawiają SEM) z co najmniej dwóch biologicznie niezależnych eksperymentów oraz 3-8 technicznych. Różnice w gęstości optycznej pomiędzy kontrolą wzrostu (KW), a resztą hodowli są: istotne statystycznie (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$), (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$), pozostałe są nieistotne statystycznie.

6.4 Dyskusja

Wiadomo, że z powodu tworzenia agregatów w roztworach wodnych, cząsteczki PNA nie są w stanie same dotrzeć do wnętrza komórki bakterii (237,242). Wykazano to w wielu innych badaniach, także tych przeprowadzonych w Laboratorium Maszyn Biomolekularnych (141,173). W związku z tym, inkubacja z wolnymi PNA nie powinna wykazywać żadnego wyciszenia poziomu fluorescencji RFP w jakimkolwiek stężeniu. Efekt ten zaobserwowano w każdym szczepie (Rysunek 96). Podobnie sam peptyd $(\text{KFF})_3\text{K}$ w badanym zakresie stężeń nie powinien mieć wpływu na zmiany fluorescencji (141,173). Wynik ten został potwierdzony w niniejszej pracy, o ile bakterie urosły podczas inkubacji z peptydem w zastosowanym stężeniu. W przeciwnym razie, brak fluorescencji jest skutkiem całkowitego zahamowania wzrostu bakterii (Rysunek 95). Sama witamina B_{12} również nie powinna hamować wzrostu bakterii, ani zmniejszać fluorescencji RFP (245), co także zaobserwowano nawet na najslabiej rosnącym mutancie ΔbtuD (Rysunek 97).

Większe wygaszanie fluorescencji RFP przez koniugaty z $\text{PNA}_{\text{anty-rfp}}$ w porównaniu do koniugatów z $\text{PNA}_{\text{scrambled}}$ jest zgodne z oczekiwaniami ze względu na liczbę komplementarnych wiązań wodorowych w utworzonych kompleksach z fragmentem RNA_{rfp} (Rysunek 88). Jest ona dwukrotnie większa w kompleksach z $\text{PNA}_{\text{anty-rfp}}$ niż z $\text{PNA}_{\text{scrambled}}$. Z tego powodu wyciszenie fluorescencji przez koniugat $(\text{KFF})_3\text{K-PNA}_{\text{scrambled}}$ jest około 50% słabsze niż w przypadku koniugatu $(\text{KFF})_3\text{K-PNA}_{\text{anty-rfp}}$. Wcześniejsze badania nad koniugatami PNA z peptydem $(\text{KFF})_3\text{K}$ wykazały taki sam wynik na szczepie dzikim *E. coli* K-12 MG1655 oraz mutancie ΔbtuB (255). W tej pracy omawiany efekt wyciszenia fluorescencji RFP zaobserwowano u wszystkich testowanych szczepów z wyjątkiem mutantu ΔsbmA , który z powodu mutacji nie jest zdolny do transportu peptydów (243). Jest to zgodne z oczekiwaniami, gdyż szczep dziki i mutanty (ΔbtuC , ΔbtuD i ΔbtuF) posiadają nienaruszone białko SbmA .

Koniugaty PNA z witaminą B_{12} nie wyciszą RFP w mutantach ΔbtuC , ΔbtuD i ΔbtuF , a we wcześniejszych badaniach również ΔbtuB (255). Spodziewano się braku wyciszenia fluorescencji, jeśli białka BtuC , BtuD i BtuF biorą udział w dostarczaniu witaminy B_{12} do komórki, tak jak jest to w przypadku białka BtuB (255). Brak wygaszania fluorescencji RFP w mutantach ΔbtuC , ΔbtuD i ΔbtuF świadczy, że każde z wymienionych białek (BtuC , BtuD i BtuF) jest niezbędne do transportu koniugatu PNA z witaminą B_{12} (Rysunek 98). W przypadku szczepu dzikiego oraz mutantu ΔsbmA , które mają pełny, nienaruszony kompleks BtuCDF , zaobserwowano częściowe wyciszenie fluorescencji RFP, ale wyłącznie podczas inkubacji bakterii z koniugatem $\text{B}_{12}\text{-PNA}_{\text{anty-rfp}}$. Białko SbmA nie jest zaangażowane w transport witaminy B_{12} , więc spodziewano się takiego efektu. Najsilniejsze wygaszenie fluorescencji występuje po inkubacji w stężeniu $16\ \mu\text{M}$ koniugatu i jest silniejsze dla *E. coli* K-12 MG1655 niż dla mutantu ΔsbmA . Efekt ten jest naturalną konsekwencją osłabienia szczepu ΔsbmA na skutek wprowadzenia mutacji. W przypadku koniugatu $\text{B}_{12}\text{-PNA}_{\text{scrambled}}$ wygaszanie fluorescencji RFP w ogóle nie jest obserwowane.

Różnice między wygaszaniem fluorescencji przez koniugaty z $(\text{KFF})_3\text{K}$ i koniugaty z witaminą B_{12} odpowiadają otrzymanym *in vitro* stabilnościom poszczególnych dupleksów, które są określone temperaturami topnienia, większymi dla koniugatów z $(\text{KFF})_3\text{K}$ (Tabela 20). Dodatni ładunek peptydu odpowiada za silniejsze oddziaływania elektrostatyczne z ujemnie naładowaną cząsteczką RNA, podczas gdy witamina B_{12} jest cząsteczką neutralną. Zbliżone wartości temperatur topnienia dla dupleksów PNA:RNA oraz $\text{B}_{12}\text{-PNA:RNA}$ wskazują, że witamina B_{12} nie przeszkadza w tworzeniu kompleksu z RNA_{rfp} , mimo, że posiada dłuższy łącnik $-(\text{CH}_2)_{12}-$, niż łącnik $-\text{eg1}-$ obecny w koniugatach z $(\text{KFF})_3\text{K}$.

6.5 Podsumowanie części III

Przeprowadzone badania udowodniły, że białka BtuC, BtuD i BtuF są tak jak białko BtuB (255) niezbędne do transportu koniugatów B₁₂-PNA do wnętrza komórek. Oznacza to, że dostarczanie zarówno samej witaminy B₁₂, jak i jej koniugatów z PNA, zachodzi przez ten sam szlak i wymaga wszystkich kolejnych receptorów błony zewnętrznej, peryplazmy i błony wewnętrznej. Jednak nie są one konieczne do wychwytu koniugatów PNA z (KFF)₃K. Wykazano również, że białko transportujące SbmA nie bierze udziału w przenoszeniu koniugatów PNA z witaminą B₁₂ do komórek *E. coli*.

7 Podsumowanie pracy

W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na poszukiwaniu nowych, potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach. Zaproponowano i zbadano trzy podejścia, które przyczyniły się do bezpośredniego zahamowania wzrostu bakterii lub umożliwiły transport cząsteczek do wnętrza ich komórek.

W strategii pierwszej, dotyczącej przeciwbakteryjnej aktywności rybozemu *hammerhead*, wyselekcjonowano trzy geny kluczowe kodujące białka niezbędne bakteriom do życia: *acpP*, *frr* i *murA*. Każde z białek zapisanych w powyższych genach odpowiada za inną, ważną funkcję w bakteriiach *E. coli*. Następnie, zaprojektowano rybozym *hammerhead* skierowany przeciwko mRNA wybranych genów jako substratowi reakcji cięcia. Do zablokowania i hydrolizy każdej z sekwencji mRNA przygotowano po dwie wersje rybozymów o krótkich lub długich komplementarnych do mRNA ramionach otrzymując sześć kompleksów substrat:rybozym. Za pomocą narzędzi obliczeniowych wykazano tworzenie się wszystkich kompleksów *in silico*. Przy pomocy metody ITC zweryfikowano powstawanie stabilnych kompleksów *in vitro*, przy czym silniejsza hybrydyzacja miała miejsce podczas wiązania fragmentów mRNA (substratów) z rybozymami o długich ramionach. Przeprowadzono *in vitro* reakcje cięcia substratów przez rybozimy. Wykazano najwyższą efektywność cięcia fragmentu mRNA o sekwencji odpowiadającej fragmentowi transkryptu *acpP*, w szczególności przez rybozym z krótkimi ramionami. W związku z tym, do badań mikrobiologicznych wybrano rybozym (o obydwu długościach ramion) skierowany przeciwko mRNA genu *acpP*. W celu ochrony rybozimu przed degradacją w komórce bakterii „schowano” go w strukturze tRNA otrzymując cztery wersje rybozymów (krótkie lub długie ramiona, samodzielny lub w strukturze tRNA) do badań *in vivo*. Sekwencje rybozymów zostały zakodowane w szczegółowo zaprojektowanych kasetach plazmidowych. Prowadzono hodowle bakterii z indukowaną produkcją w trzech pożywkach i najlepsze warunki do obserwacji cięcia mRNA bakteryjnego określono dla pożywki Davisa. Udowodniono działanie przeciwbakteryjne dwóch wersji rybozymów o długich ramionach, przy czym rybozym występujący samodzielnie okazał się bardziej skuteczny niż ukryty w strukturze tRNA. Ponadto, wykazano synergiię wszystkich wersji rybozimu z tetracykliną. Udowodniono, że rybozym *hammerhead* efektywnie tnie mRNA bakteryjne. W przyszłych badaniach należy skupić się na innym, efektywnym sposobie dostarczania rybozymów do komórki bakterii oraz wyborze mRNA odpowiednich genów kluczowych dla bakterii, jak również przetestowaniem innego miejsca cięcia w mRNA.

W strategii drugiej na temat przeciwbakteryjnego działania peptydów i peptydomimetyków, z trzech niezmodyfikowanych peptydów (W-MreB₁₋₉, anoplina i (KFF)₃K) wyłoniono anoplinę jako cząsteczkę z największym potencjałem do dalszych badań nad zwiększeniem aktywności przeciwbakteryjnej. Przetestowano jej trzy analogi (dwa zmodyfikowane i „zsyte” w pozycjach [2-6] i [5-9] oraz jeden zmodyfikowany S₅(5,9)) na bakteriiach Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Wykazano, że takie pochodne anopliny są skuteczniejsze w hamowaniu wzrostu bakterii. W szczególności anoplina[2-6], która wykazała wysoką, nawet 16-krotnie większą aktywność przeciw szczepom Gram-ujemnym, w tym patogenym *E. coli* ESKL+. Z kolei anoplina[5-9] i anoplinaS₅(5,9) spowodowały wyższą, również nawet 16-krotną, wrażliwość szczepów Gram-dodatnich, w tym *S. aureus* MRSA, powodując zahamowanie ich wzrostu w znacznie niższych stężeniach. Udowodnione działanie przeciwbakteryjne analogów anopliny otwiera ścieżkę do poszukiwań kolejnych peptydów w celu zwiększania ich aktywności przeciwbakteryjnej metodą stabilizacji struktury drugorzędowej poprzez tzw. „zsytywanie”.

Strategię trzecią dotyczącą transportu koniugatów PNA z witaminą B₁₂ lub peptydem (KFF)₃K do komórek *E. coli* rozpoczęto od przygotowania wektora plazmidowego zawierającego gen białka czerwonej fluorescencji. Wyznaczono temperatury topnienia dupleksów: PNA z RNA, koniugatu PNA z witaminą B₁₂ z RNA oraz koniugatu PNA z (KFF)₃K z RNA. Wykazano, że transport koniugatów PNA z

witaminą B₁₂ zachodzi przez tę samą ścieżkę, co sama witamina. Oznacza to, że koniugat witamina B₁₂-PNA wymaga zarówno kompleksu białek BtuCD, jak i białka BtuF. Potwierdzono, że PNA nie może samoistnie wnikać do komórki bakterii, ale potrzebuje transportera. W przypadku, gdy transporterem był peptyd (KFF)₃K, koniugaty były transportowane przez białko SbmA w błonie wewnętrznej. Powiązano wyniki temperatur topnienia z wynikami *in vivo* transportu koniugatów PNA w komórkach bakterii. Tym samym, dowiedziono, że za silniejszą hybrydyzację koniugatu PNA z nośnikiem peptydowym z docelowym mRNA w komórce *E. coli* odpowiada kationowy charakter peptydu. Potwierdzenie, że PNA wchodzi do komórki bakterii tym samym szlakiem co witamina B₁₂, daje możliwość wykorzystania podobnych szlaków opartych na systemie TonB do wprowadzania oligonukleotydów lub innych związków do bakterii na zasadzie strategii „konja trojańskiego”.

Podsumowując, cele badań założone w rozprawie doktorskiej zostały osiągnięte. Otrzymane wyniki dostarczają informacji potrzebnych do poszukiwania nowych, potencjalnych związków przeciwbakteryjnych. Wskazują, jak opracowywać biologicznie aktywne cząsteczki bazujące na enzymach RNA, modyfikowanych peptydach oraz proponują nowe sposoby dostarczania cząsteczek do wnętrza komórek *E. coli* poprzez ścieżkę transportu witaminy B₁₂.

Bibliografia

1. Haas LF. Papyrus of Ebers and Smith. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1 listopad 1999;67(5):578–578.
2. Porter JR. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev*. czerwiec 1976;40(2):260–9.
3. Pancu DF, Scurtu A, Macasoi IG, Marti D, Mioc M, Soica C, i in. Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmacotoxicological Screening. *Antibiotics*. 7 kwiecień 2021;10(4):401.
4. Bosch F, Rosich L. The Contributions of Paul Ehrlich to Pharmacology: A Tribute on the Occasion of the Centenary of His Nobel Prize. *Pharmacology*. 2008;82(3):171–9.
5. Bhandari V, Suresh A. Next-Generation Approaches Needed to Tackle Antimicrobial Resistance for the Development of Novel Therapies Against the Deadly Pathogens. *Front Pharmacol*. 2 czerwiec 2022;13.
6. Gaynes R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg Infect Dis*. maj 2017;23(5):849–53.
7. Silver LL. Challenges of Antibacterial Discovery. *Clin Microbiol Rev*. styczeń 2011;24(1):71–109.
8. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, i in. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. luty 2022;399(10325):629–55.
9. O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London; 2014 grudź.
10. Sokołowska M, Wszelaka-Rylik M, Poznański J, Bal W. Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin☆. *J Inorg Biochem*. lipiec 2009;103(7):1005–13.
11. Trapaidze A, Hureau C, Bal W, Winterhalter M, Faller P. Thermodynamic study of Cu²⁺ binding to the DAHK and GHK peptides by isothermal titration calorimetry (ITC) with the weaker competitor glycine. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 4 styczeń 2012;17(1):37–47.
12. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*. maj 1989;179(1):131–7.
13. Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*. styczeń 1999;12(1):3–18.
14. Freyer MW, Lewis EA. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. W 2008. s. 79–113.
15. Stokes GG. On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*. 1851;9:8–106.

16. Debye P, Hückel E. The Theory of Electrolytes I. Lowering of Freezing Point and Related Phenomena. *Physikalische Zeitschrift*. 1923;24:185–206.
17. Ślósarek G. Analiza ilościowa, Metody rozdzielania makrocząsteczek, Elektroforeza. W: *Biofizyka molekularna Zjawiska Instrumenty Modelowanie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2011. s. 368–70.
18. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*. 2 styczeń 2019;2019(1):pdb.top100388.
19. Petrov A, Tsa A, Puglisi JD. Analysis of RNA by Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis. W 2013. s. 301–13.
20. Viney C, Fenton RA. Physics and gel electrophoresis: using terminal velocity to characterize molecular weight. *Eur J Phys*. 1 listopad 1998;19(6):575–80.
21. de Broglie L. Recherches sur la théorie des Quanta. *Ann Phys (Paris)*. 1924;10(3).
22. Gwoździński K, Koceva-Chyła A. Podstawy spektroskopii UV-Vis. W: *Biofizyka Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. I*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2005. s. 91–8.
23. van 't Hoff JH. Études de Dynamique chimique (Studies in Dynamic Chemistry). 1884.
24. Nilapwar SM, Nardelli M, Westerhoff H V., Verma M. Absorption Spectroscopy. W 2011. s. 59–75.
25. Ślósarek G. Spektroskopia absorpcyjna. W: *Biofizyka molekularna Zjawiska Instrumenty Modelowanie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2011. s. 456–8.
26. Sugimoto N. Stability of Non-canonical Nucleic Acids. W: *Chemistry and Biology of Non-Canonical Nucleic Acids*. Wiley; 2021. s. 33–50.
27. Owczarzy R. Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis. *Biophys Chem*. październik 2005;117(3):207–15.
28. Puglisi JD, Tinoco I. Absorbance melting curves of RNA. W: *Methods in enzymology*. 1989. s. 304–25.
29. Breslauer KJ. Extracting Thermodynamic Data From Equilibrium Melting Curves for Oligonucleotide Order-Disorder Transitions. W: *Methods in Molecular Biology*. 1994. s. 347–72.
30. Kęcki Z. Podstawy spektroskopii molekularnej. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1998.
31. Ladokhin AS. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. W: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley; 2000.
32. dos Santos Rodrigues FH, Delgado GG, Santana da Costa T, Tasic L. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and intermolecular contacts. *BBA Advances*. 2023;3:100091.
33. Ślósarek G. Fluorescencja i fosforescencja. W: *Biofizyka molekularna Zjawiska Instrumenty Modelowanie*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2011. s. 464–6.
34. Bryszewska M. Procesy fizyczne zachodzące w cząsteczce znacznika po pochłonięciu przez nią fotonu. W: *Biofizyka Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. I*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2005. s. 135–40.

35. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. *Natl Med J India*. 1992;5(3):115–9.
36. Booth CS, Pienaar E, Termaat JR, Whitney SE, Louw TM, Viljoen HJ. Efficiency of the polymerase chain reaction. *Chem Eng Sci*. wrzesień 2010;65(17):4996–5006.
37. Roberts RJ, Murray K. Restriction Endonuclease. *CRC Crit Rev Biochem*. 26 styczeń 1976;4(2):123–64.
38. Ashwini M, Murugan SB, Balamurugan S, Sathishkumar R. Advances in molecular cloning. *Mol Biol*. 30 styczeń 2016;50(1):1–6.
39. Lessard JC. Molecular Cloning. W 2013. s. 85–98.
40. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments*. 1 sierpień 2007;(6).
41. Singh M, Yadav A, Ma X, Amoah E. Plasmid DNA transformation in *Escherichia Coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl₂ treated cells. *International Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2010;6:561–8.
42. Rynans S, de Walthoffen SW, Dzieciatkowski T, Młynarczyk G. Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii. *Postępy Mikrobiologii*. 2015;54(1):75–82.
43. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. październik 1996;6(10):986–94.
44. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 15 wrzesień 2021;49(5):800–12.
45. Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 1 październik 2000;25(2):169–93.
46. Tyburski J, Studzińska A, Dąca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. *Metody analizy danych. Biotechnologia*. 2008;1(80):86–96.
47. Spiess AN, Neumeyer N. An evaluation of R² as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol*. 7 grudzień 2010;10(1):6.
48. Machnik G, Bednarek I. Ilościowa ocena aktywności transkrypcyjnej genów i ich kopijności oparta na technice Real TimeTM PCR. W: *Inżynieria genetyczna i terapia genowa : zagadnienia podstawowe i aspekty praktyczne* . I. Katowice: Śląski Uniwersytet Medyczny; 2008. s. 87–92.
49. Patel JB, Cockerill FR, Bradford PA, Eliopoulos GM, Hindler JA, Jenkins SG, i in. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015;35(2).
50. EUCAST Definitive Document, Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. *Clin Microbiol Infect*. maj 1998;4(5):291.
51. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. 4 luty 2021;10(2):165.
52. Lavogina D, Lust H, Tahk MJ, Laasfeld T, Vellama H, Nasirova N, i in. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors (Basel)*. 25 marzec 2022;12(4):196.

53. Underhill L, Bradfield D. IntroSTAT. 2nd wyd. Cape Town, Rondebosh, South Africa: Juta & Co, LTD; 1996. 181–182 s.
54. Altman DG, Bland JM. Standard deviations and standard errors. *BMJ*. 15 październik 2005;331(7521):903.
55. Barde MP, Barde PJ. What to use to express the variability of data: Standard deviation or standard error of mean? *Perspect Clin Res*. 2012;3(3):113.
56. Matthews JNS, Altman DG. Statistics Notes: Interaction 2: compare effect sizes not P values. *BMJ*. 28 wrzesień 1996;313(7060):808–808.
57. Altman DG, Bland JM. Statistics notes: Absence of evidence is not evidence of absence. *BMJ*. 19 sierpień 1995;311(7003):485–485.
58. Wechsler S. Statistics at Square One. 9th wyd. Campbell MJ, redaktor. T. 16, Statistics in Medicine. London: BMJ Publ. Group; 1997. 2629–2630 s.
59. Aczel AD, Sounderpandian J. Statystyka w Zarządzaniu. Bartosz Witkowski. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2000. 389–391 s.
60. Koronacki J, Mielniczuk J. Statystyka dla studentów kierunków technicznych i przyrodniczych . Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne; 2006. 320–343 s.
61. Bedyńska S, Cypryańska M. Statystyczny drogowskaz 2. Praktyczne wprowadzenie do analizy wariancji. (rozdział 3). Warszawa: Wydawnictwo Akademickie Sedno/Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej ; 2013. 63–95 s.
62. Abidoye A. O, Egburonu O. D, Adewara AA, Popoola J. Application of Minimum Bayes Factor to a Balanced Two-Way Anova with Random Effects. *Formosa Journal of Multidisciplinary Research*. 31 marzec 2023;2(3):585–604.
63. Kenney JF, Keeping ES. Mathematics of Statistics. W: Linear Regression and Correlation. 3rd wyd. 1962. s. 252–85.
64. Wolberg J. The Method of Least Squares. W: Data Analysis Using the Method of Least Squares. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2006. s. 31–71.
65. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. luty 2015;21(2):109–17.
66. Richter TKS, Michalski JM, Zanetti L, Tennant SM, Chen WH, Rasko DA. Responses of the Human Gut Escherichia coli Population to Pathogen and Antibiotic Disturbances. *mSystems*. 28 sierpień 2018;3(4).
67. Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth MES. Menaquinone (Vitamin K2) Biosynthesis: Localization and Characterization of the menAGene from Escherichia coli. *J Bacteriol*. 15 maj 1998;180(10):2782–7.
68. Hossain KS, Amarasena S, Mayengbam S. B Vitamins and Their Roles in Gut Health. *Microorganisms*. 7 czerwiec 2022;10(6):1168.
69. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol*. luty 2004;2(2):123–40.

70. Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 14 wrzesień 2021;22(18):9922.
71. Wang D, Farhana A. *Biochemistry, RNA Structure*. 2024.
72. Chen Y, Varani G. *RNA Structure*. W: *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley; 2010.
73. Li J, Liu C. Coding or Noncoding, the Converging Concepts of RNAs. *Front Genet*. 22 maj 2019;10.
74. Yang L, Ke Y. Noncoding RNA, a new focus of functional genomic study. *Beijing da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Peking University Health sciences*. 18 sierpień 2006;38(4):444–6.
75. Rombouts S, Nollmann M. RNA imaging in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 16 marzec 2021;45(2).
76. Doudna JA, Cech TR. The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*. 2002.
77. Orita M, Vinayak R, Andrus A, Takagi Y, Chiba A, Kaniwa H, i in. Magnesium is essential for formation of an active complex of a hammerhead ribozyme with its substrate: an investigation by NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1995;(34):219–20.
78. Inoue A, Takagi Y, Taira K. Importance of magnesium ions in the mechanism of catalysis by a hammerhead ribozyme: Strictly linear relationship between the ribozyme activity and the concentration of magnesium ions. *Magnes Res*. 2003;
79. Silverman SK. *Nucleic Acid Enzymes (Ribozymes and Deoxyribozymes): In Vitro Selection and Application*. W: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. 2008.
80. Tanner NK. Ribozymes: The characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999.
81. Talini G, Gallori E, Maurel MC. Natural and unnatural ribozymes: Back to the primordial RNA world. *Res Microbiol*. wrzesień 2009;160(7):457–65.
82. Weinger JS. Solid phase synthesis and binding affinity of peptidyl transferase transition state mimics containing 2'-OH at P-site position A76. *Nucleic Acids Res*. 23 luty 2004;32(4):1502–11.
83. Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol*. 26 grudzień 2003;21(12):1457–65.
84. Serganov A, Patel DJ. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet*. 11 październik 2007;8(10):776–90.
85. Cochrane JC, Lipchock S V., Smith KD, Strobel SA. Structural and Chemical Basis for Glucosamine 6-Phosphate Binding and Activation of the *glmS* Ribozyme. *Biochemistry*. 21 kwiecień 2009;48(15):3239–46.
86. Valadkhan S, Manley JL. Splicing-related catalysis by protein-free snRNAs. *Nature*. październik 2001;413(6857):701–7.
87. de la Peña M, García-Robles I, Cervera A. The Hammerhead Ribozyme: A Long History for a Short RNA. *Molecules*. 4 styczeń 2017;22(1):78.
88. Hammann C, Luptak A, Perreault J, de la Peña M. The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*. maj 2012;18(5):871–85.

89. Deng J, Shi Y, Peng X, He Y, Chen X, Li M, i in. Ribocentre: a database of ribozymes. *Nucleic Acids Res.* 6 styczeń 2023;51(D1):D262–8.
90. Weinberg CE, Weinberg Z, Hammann C. Novel ribozymes: discovery, catalytic mechanisms, and the quest to understand biological function. *Nucleic Acids Res.* 10 październik 2019;47(18):9480–94.
91. Pavco PA, Bouhana KS, Gallegos AM, Agrawal A, Blanchard KS, Grimm SL, i in. Antitumor and antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors. *Clin Cancer Res.* maj 2000;6(5):2094–103.
92. Weng DE, Usman N. Angiozyme: A Novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep.* marzec 2001;3(2):141–6.
93. Morrow PK, Murthy RK, Ensor JD, Gordon GS, Margolin KA, Elias AD, i in. An open-label, phase 2 trial of RPI.4610 (angiozyme) in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer.* 26 wrzesień 2012;118(17):4098–104.
94. He P, Zhu D, Hu JJ, Peng J, Chen LS, Lu GX. pcDNA3.1(–)-mediated ribozyme targeting of HER-2 suppresses breast cancer tumor growth. *Mol Biol Rep.* 15 marzec 2010;37(3):1597–604.
95. Reese DM, Slamon DJ. HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer. *Stem Cells.* styczeń 1997;15(1):1–8.
96. Suzuki T, Anderegg B, Ohkawa T, Irie A, Engebraaten O, Halks-Miller M, i in. Adenovirus-mediated ribozyme targeting of HER-2/neu inhibits in vivo growth of breast cancer cells. *Gene Ther.* 1 luty 2000;7(3):241–8.
97. Tafach A, Bassett T, Sparanese D, Lee C. Destroying RNA as a Therapeutic Approach. *Curr Med Chem.* 1 kwiecień 2006;13(8):863–81.
98. Patutina OA, Mironova NL, Vlassov V V, Zenkova MA. New approaches for cancer treatment: antitumor drugs based on gene-targeted nucleic acids. *Acta Naturae.* lipiec 2009;1(2):44–60.
99. Peracchi A. Prospects for antiviral ribozymes and deoxyribozymes. *Rev Med Virol.* 5 styczeń 2004;14(1):47–64.
100. Trepanier JB, Tanner JE, Alfieri C. Oligonucleotide-Based Therapeutic Options against Hepatitis C Virus Infection. *Antivir Ther.* 1 kwiecień 2006;11(3):273–87.
101. Amado RG, Mitsuyasu RT, Rosenblatt JD, Ngok FK, Bakker A, Cole S, i in. Anti-Human Immunodeficiency Virus Hematopoietic Progenitor Cell-Delivered Ribozyme in a Phase I Study: Myeloid and Lymphoid Reconstitution in Human Immunodeficiency Virus Type-1–Infected Patients. *Hum Gene Ther.* marzec 2004;15(3):251–62.
102. Macpherson JL, Boyd MP, Arndt AJ, Todd A V., Fanning GC, Ely JA, i in. Long-term survival and concomitant gene expression of ribozyme-transduced CD4+ T-lymphocytes in HIV-infected patients. *J Gene Med.* 17 maj 2005;7(5):552–64.
103. Abu-Baker A, Kharma N, Perreault J, Grant A, Shekarabi M, Maios C, i in. RNA-Based Therapy Utilizing Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Transcript Knockdown and Replacement. *Mol Ther Nucleic Acids.* kwiecień 2019;15:12–25.

104. Kharma N, Varin L, Abu-Baker A, Ouellet J, Najeh S, Ehdavevand MR, i in. Automated design of hammerhead ribozymes and validation by targeting the PABPN1 gene transcript. *Nucleic Acids Res.* 29 luty 2016;44(4):e39–e39.
105. Langlois MA, Lee NS, Rossi JJ, Puymirat J. Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Molecular Therapy.* maj 2003;7(5):670–80.
106. Nawrot B, Antoszczyk S, Maszewska M, Kuwabara T, Warashina M, Taira K, i in. Efficient inhibition of β -secretase gene expression in HEK293 cells by tRNA^{Val}-driven and CTE-helicase associated hammerhead ribozymes. *Eur J Biochem.* 12 październik 2003;270(19):3962–70.
107. Hayashita-Kinoh H, Yamada M, Yokota T, Mizuno Y, Mochizuki H. Down-regulation of α -synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model. *Biochem Biophys Res Commun.* marzec 2006;341(4):1088–95.
108. Grzelinski M, Steinberg F, Martens T, Czubayko F, Lamszus K, Aigner A. Enhanced Antitumorigenic Effects in Glioblastoma on Double Targeting of Pleiotrophin and Its Receptor ALK. *Neoplasia.* luty 2009;11(2):145–56.
109. Watson ZL, Washington SD, Phelan DM, Lewin AS, Tuli SS, Schultz GS, i in. In Vivo Knockdown of the Herpes Simplex Virus 1 Latency-Associated Transcript Reduces Reactivation from Latency. *J Virol.* 15 sierpień 2018;92(16).
110. Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbuthnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol.* lipiec 2000;33(1):142–51.
111. Lieber A, He CY, Polyak SJ, Gretch DR, Barr D, Kay MA. Elimination of hepatitis C virus RNA in infected human hepatocytes by adenovirus-mediated expression of ribozymes. *J Virol.* grudzień 1996;70(12):8782–91.
112. Lazarev V, Shmarov M, Zakhartchouk A, Yurov G, Misurina O, Akopian T, i in. Inhibition of influenza A virus reproduction by a ribozyme targeted against PB1 mRNA. *Antiviral Res.* maj 1999;42(1):47–57.
113. Efrat S, Leiser M, Wu YJ, Fusco-DeMane D, Emran OA, Surana M, i in. Ribozyme-mediated attenuation of pancreatic beta-cell glucokinase expression in transgenic mice results in impaired glucose-induced insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 15 marzec 1994;91(6):2051–5.
114. Kong XJ. Maxizyme-mediated specific inhibition on mutant-type p53 in vitro. *World J Gastroenterol.* 2003;9(7):1571.
115. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G. Autolytic Processing of Dimeric Plant Virus Satellite RNA. *Science* (1979). 28 marzec 1986;231(4745):1577–80.
116. Hutchins CJ, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(9):3627–40.
117. Birikh KR, Heaton PA, Eckstein F. The Structure, Function and Application of the Hammerhead Ribozyme. *Eur J Biochem.* 16 kwiecień 1997;245(1):1–16.
118. Kore A. Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res.* 15 wrzesień 1998;26(18):4116–20.

119. Lilley DMJ. Classification of the nucleolytic ribozymes based upon catalytic mechanism. *F1000Res*. 19 sierpień 2019;8:1462.
120. Yadava RS, Kumar R, Yadava PK. Expression of *lexA* targeted ribozyme in *Escherichia coli* BL-21 (DE3) cells. *Mol Cell Biochem*. marzec 2005;271(1–2):197–203.
121. Junn E, Kang C. Detection of hammerhead ribozyme-mediated cleavage and reduced expression of *LacZ'* mRNA in *E. coli*. *Genet Anal*. maj 1996;13(1):1–7.
122. Tan XX, Rose K, Margolin W, Chen Y. DNA Enzyme Generated by a Novel Single-Stranded DNA Expression Vector Inhibits Expression of the Essential Bacterial Cell Division Gene *ftsZ*. *Biochemistry*. 1 luty 2004;43(4):1111–7.
123. Toumpeki C, Anastasakis D, Panagoulas I, Stamatopoulou V, Georgakopoulos T, Kallia-Raftopoulos S, i in. Construction of an M1GS Ribozyme for Targeted and Rapid mRNA Cleavage; Application on the *Ets-2* Oncogene. *Med Chem (Los Angeles)*. 12 lipiec 2018;14(6):604–16.
124. Równicki M, Wojciechowska M, Wierzba AJ, Czarnecki J, Bartosik D, Gryko D, i in. Vitamin B12 as a carrier of peptide nucleic acid (PNA) into bacterial cells. *Sci Rep*. 9 sierpień 2017;7(1):7644.
125. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, i in. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (1979). 5 wrzesień 1997;277(5331):1453–62.
126. Magnuson K, Jackowski S, Rock CO, Cronan JE. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. wrzesień 1993;57(3):522–42.
127. Byers DM, Gong H. Acyl carrier protein: structure–function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry and Cell Biology*. grudzień 2007;85(6):649–62.
128. Gronow S, Brade H. Invited review: Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive? *J Endotoxin Res*. 3 luty 2001;7(1):3–23.
129. Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS. Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. sierpień 2016;306(5):290–301.
130. Issartel JP, Koronakis V, Hughes C. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature*. czerwiec 1991;351(6329):759–61.
131. Brown ED, Vivas EI, Walsh CT, Kolter R. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. lipiec 1995;177(14):4194–7.
132. Janosi L, Shimizu I, Kaji A. Ribosome recycling factor (ribosome releasing factor) is essential for bacterial growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 10 maj 1994;91(10):4249–53.
133. Tolmasky ME. Plasmids. W: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013. s. 362–6.
134. Lloyd GS, Thomas CM. Microbial Primer: The logic of bacterial plasmids. *Microbiology (N Y)*. 3 lipiec 2023;169(7).
135. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*. czerwiec 1961;3(3):318–56.

136. Ramos JL, García-Salamanca A, Molina-Santiago C, Udaondo Z. Operon. W: Brenner's Encyclopedia of Genetics. Elsevier; 2013. s. 176–80.
137. Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, i in. Genome Sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3). J Mol Biol. grudzień 2009;394(4):644–52.
138. Du F, Liu YQ, Xu YS, Li ZJ, Wang YZ, Zhang ZX, i in. Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. Microb Cell Fact. 26 grudzień 2021;20(1):189.
139. Nie Y, Yan W, Xu Y, Chen WB, Mu XQ, Wang X, i in. High-Level Expression of Bacillus naganoensis Pullulanase from Recombinant Escherichia coli with Auto-Induction: Effect of lac Operator. PLoS One. 23 październik 2013;8(10):e78416.
140. Davis BD. The Isolation of Biochemically Deficient Mutants of Bacteria by Means of Penicillin. Proceedings of the National Academy of Sciences. styczeń 1949;35(1):1–10.
141. Castillo JI, Równicki M, Wojciechowska M, Trylska J. Antimicrobial synergy between mRNA targeted peptide nucleic acid and antibiotics in E. coli. Bioorg Med Chem Lett. październik 2018;28(18):3094–8.
142. Równicki M, Dąbrowska Z, Wojciechowska M, Wierzbą AJ, Maximova K, Gryko D, i in. Inhibition of Escherichia coli Growth by Vitamin B12 –Peptide Nucleic Acid Conjugates. ACS Omega. 31 styczeń 2019;4(1):819–24.
143. Shimayama T, Nishikawa S, Taira K. Generality of the NUX Rule: Kinetic Analysis of the Results of Systematic Mutations in the Trinucleotide at the Cleavage Site of Hammerhead Ribozymes. Biochemistry. 21 marzec 1995;34(11):3649–54.
144. Ferbeyre G, Smith JM, Cedergren R. Schistosome Satellite DNA Encodes Active Hammerhead Ribozymes. Mol Cell Biol. 1 lipiec 1998;18(7):3880–8.
145. Chen YJ, Liu P, Nielsen AAK, Brophy JAN, Clancy K, Peterson T, i in. Characterization of 582 natural and synthetic terminators and quantification of their design constraints. Nat Methods. 2 lipiec 2013;10(7):659–64.
146. Huang X, Zhao Y, Pu Q, Liu G, Peng Y, Wang F, i in. Intracellular selection of trans-cleaving hammerhead ribozymes. Nucleic Acids Res. 2019;
147. Medina MFC, Joshi S. Design, characterization and testing of tRNA^{3Lys}-based hammerhead ribozymes. Nucleic Acids Res. 1 kwiecień 1999;27(7):1698–708.
148. Chowrira BM, Pavco PA, McSwiggen JA. In vitro and in vivo comparison of hammerhead, hairpin, and hepatitis delta virus self-processing ribozyme cassettes. J Biol Chem. 14 październik 1994;269(41):25856–64.
149. Stage TK, Hertel KJ, Uhlenbeck OC. Inhibition of the hammerhead ribozyme by neomycin. RNA. marzec 1995;1(1):95–101.
150. Tor Y, Hermann T, Westhof E. Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme. Chem Biol. listopad 1998;5(11):R277–83.
151. Krefft D, Prusinowski M, Maciszka P, Skokowska A, Zebrowska J, Skowron PM. T7-lac promoter vectors spontaneous derepression caused by plant-derived growth media may lead to serious expression problems: a systematic evaluation. Microb Cell Fact. 28 grudzień 2022;21(1):13.

152. Chaudhuri RR, Sebaihia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, i in. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strain O42. *PLoS One*. 20 styczeń 2010;5(1):e8801.
153. Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, i in. Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*. styczeń 2001;409(6819):529–33.
154. Makino K. Complete Nucleotide Sequences of 93-kb and 3.3-kb Plasmids of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Derived from Sakai Outbreak. *DNA Research*. 1 styczeń 1998;5(1):1–9.
155. Cooper KK, Mandrell RE, Louie JW, Korch J, Clark TA, Parker CT, i in. Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7. *BMC Genomics*. 10 grudzień 2014;15(1):17.
156. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, i in. Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69. *J Bacteriol*. styczeń 2009;191(1):347–54.
157. Kyle JL, Cummings CA, Parker CT, Quiñones B, Vatta P, Newton E, i in. *Escherichia coli* Serotype O55:H7 Diversity Supports Parallel Acquisition of Bacteriophage at Shiga Toxin Phage Insertion Sites during Evolution of the O157:H7 Lineage. *J Bacteriol*. 15 kwiecień 2012;194(8):1885–96.
158. Rasko DA, Rosovitz MJ, Myers GSA, Mongodin EF, Fricke WF, Gajer P, i in. The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *J Bacteriol*. 15 październik 2008;190(20):6881–93.
159. Crossman LC, Chaudhuri RR, Beatson SA, Wells TJ, Desvaux M, Cunningham AF, i in. A Commensal Gone Bad: Complete Genome Sequence of the Prototypical Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain H10407. *J Bacteriol*. listopad 2010;192(21):5822–31.
160. Shepard SM, Danzeisen JL, Isaacson RE, Seemann T, Achtman M, Johnson TJ. Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of K88- and F18-Positive Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 15 styczeń 2012;194(2):395–405.
161. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, i in. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 24 grudzień 2002;99(26):17020–4.
162. Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, i in. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 kwiecień 2006;103(15):5977–82.
163. Forde BM, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Phan MD, Totsika M, Peters KM, i in. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* EC958: A High Quality Reference Sequence for the Globally Disseminated Multidrug Resistant *E. coli* O25b:H4-ST131 Clone. *PLoS One*. 15 sierpień 2014;9(8):e104400.
164. Carbonell A, De la Peña M, Flores R, Gago S. Effects of the trinucleotide preceding the self-cleavage site on eggplant latent viroid hammerheads: differences in co- and post-transcriptional self-cleavage may explain the lack of trinucleotide AUC in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res*. listopad 2006;34(19):5613–22.

165. Wang JP, Enjoji M, Tiebel M, Ochsner S, Chan L, Teng BB. Hammerhead Ribozyme Cleavage of Apolipoprotein B mRNA Generates a Truncated Protein. *Journal of Biological Chemistry*. sierpień 1999;274(34):24161–70.
166. Nakamaye KL, Eckstein F. AUA-Cleaving Hammerhead Ribozymes: Attempted Selection for Improved Cleavage. *Biochemistry*. 8 luty 1994;33(5):1271–7.
167. Srivastava V, Mishra S, Chaudhuri TK. Enhanced production of serratiopeptidase in *Escherichia coli* and its characterization as a potential biosimilar to native biotherapeutic counterpart. *Microb Cell Fact*. 17 grudzień 2019;18(1):215.
168. Diaz Ricci JC, Hernández ME. Plasmid Effects on *Escherichia coli* Metabolism. *Crit Rev Biotechnol*. 29 styczeń 2000;20(2):79–108.
169. Ow DSW, Nissom PM, Philp R, Oh SKW, Yap MGS. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 α during batch fermentation. *Enzyme Microb Technol*. lipiec 2006;39(3):391–8.
170. Acar JF. Antibiotic synergy and antagonism. *Medical Clinics of North America*. listopad 2000;84(6):1391–406.
171. Kamble E, Sanghvi P, Pardesi K. Synergistic effect of antibiotic combinations on *Staphylococcus aureus* biofilms and their persister cell populations. *Biofilm*. grudzień 2022;4:100068.
172. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. sierpień 2016;6(8):a025247.
173. Równicki M, Pieńko T, Czarnecki J, Kolanowska M, Bartosik D, Trylska J. Artificial Activation of *Escherichia coli* mazEF and hipBA Toxin–Antitoxin Systems by Antisense Peptide Nucleic Acids as an Antibacterial Strategy. *Front Microbiol*. 26 listopad 2018;9.
174. Zhou Y, Peng Y. Synergistic effect of clinically used antibiotics and peptide antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp Ther Med*. październik 2013;6(4):1000–4.
175. Macyszyn J, Burmistrz M, Mieczkowski A, Wojciechowska M, Trylska J. Conjugates of Aminoglycosides with Stapled Peptides as a Way to Target Antibiotic-Resistant Bacteria. *ACS Omega*. 30 maj 2023;8(21):19047–56.
176. Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 13 czerwiec 2018;285(1880):20180789.
177. Savageau MA. *Escherichia coli* Habitats, Cell Types, and Molecular Mechanisms of Gene Control. *Am Nat*. grudzień 1983;122:732–44.
178. Tortora GJ, Funke BR, Case LC. *Microbiology: An Introduction*. 7th edition. Boston, New York: Pearson Education Inc.; 2002. 77–89 s.
179. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1 maj 2010;2(5):a000414–a000414.
180. Baj J, Bartosik D, Dziewit Ł, Jagusztyn-Krynicka E, Markiewicz Z, Piekarowicz A, i in. *Biologia molekularna bakterii*. 2. wyd. Baj J, Markiewicz Z, Kruczyńska K, redaktorzy. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA; 2015. 33–72 s.

181. Palusińska-Szys M, Zdybicka-Barabas A, Luchowski R, Reszczyńska E, Śmiałek J, Mak P, i in. Choline Supplementation Sensitizes *Legionella dumoffii* to *Galleria mellonella* Apolipophorin III. *Int J Mol Sci.* 13 sierpień 2020;21(16):5818.
182. Forbes J, Krishnamurthy K. *Biochemistry, Peptide.* 2024.
183. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 16 październik 2020;11.
184. Wojciechowska M, Miszkiewicz J, Trylska J. Conformational Changes of Anoplin, W-MreB1–9, and (KFF)3K Peptides near the Membranes. *Int J Mol Sci.* 18 grudzień 2020;21(24):9672.
185. Konno K, Hisada M, Fontana R, Lorenzi CCB, Naoki H, Itagaki Y, i in. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* listopad 2001;1550(1):70–80.
186. Ifrah D, Doisy X, Ryge TS, Hansen PR. Structure-activity relationship study of anoplin. *Journal of Peptide Science.* 15 luty 2005;11(2):113–21.
187. Uggerhøj LE, Poulsen TJ, Munk JK, Fredborg M, Sondergaard TE, Frimodt-Møller N, i in. Rational Design of Alpha-Helical Antimicrobial Peptides: Do's and Don'ts. *ChemBioChem.* 19 styczeń 2015;16(2):242–53.
188. Figge RM, Divakaruni A V., Gober JW. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* 4 marzec 2004;51(5):1321–32.
189. Saikia K, Sravani YD, Ramakrishnan V, Chaudhary N. Highly potent antimicrobial peptides from N-terminal membrane-binding region of *E. coli* MreB. *Sci Rep.* 23 luty 2017;7(1):42994.
190. Saikia K, Chaudhary N. Interaction of MreB-derived antimicrobial peptides with membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* marzec 2018;498(1):58–63.
191. Macyszyn J, Chyży P, Burmistrz M, Lobka M, Miszkiewicz J, Wojciechowska M, i in. Structural dynamics influences the antibacterial activity of a cell-penetrating peptide (KFF)3K. *Sci Rep.* 8 wrzesień 2023;13(1):14826.
192. Kulik M, Markowska-Zagrajek A, Wojciechowska M, Grzela R, Witula T, Trylska J. Helix 69 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA as a peptide nucleic acid target. *Biochimie.* lipiec 2017;138:32–42.
193. Sarkar T, Chetia M, Chatterjee S. Antimicrobial Peptides and Proteins: From Nature's Reservoir to the Laboratory and Beyond. *Front Chem.* 18 czerwiec 2021;9.
194. Garvey M. Antimicrobial Peptides Demonstrate Activity against Resistant Bacterial Pathogens. *Infect Dis Rep.* 14 sierpień 2023;15(4):454–69.
195. Rodziewicz-Motowidło S, Mickiewicz B, Greber K, Sikorska E, Szultka Ł, Kamysz E, i in. Antimicrobial and conformational studies of the active and inactive analogues of the protegrin-1 peptide. *FEBS J.* 27 luty 2010;277(4):1010–22.
196. Bird GH, Christian Crannell W, Walensky LD. Chemical Synthesis of Hydrocarbon-Stapled Peptides for Protein Interaction Research and Therapeutic Targeting. *Curr Protoc Chem Biol.* wrzesień 2011;3(3):99–117.

197. Cromm PM, Spiegel J, Grossmann TN. Hydrocarbon Stapled Peptides as Modulators of Biological Function. *ACS Chem Biol*. 19 czerwiec 2015;10(6):1362–75.
198. Chapuis H, Slaninová J, Bednářová L, Monincová L, Buděšínský M, Čeřovský V. Effect of hydrocarbon stapling on the properties of α -helical antimicrobial peptides isolated from the venom of hymenoptera. *Amino Acids*. 17 listopad 2012;43(5):2047–58.
199. Dinh TTT, Kim DH, Lee BJ, Kim YW. De Novo Design and Their Antimicrobial Activity of Stapled Amphipathic Helices of Heptapeptides. *Bull Korean Chem Soc*. 20 grudzień 2014;35(12):3632–6.
200. Luong HX, Kim DH, Lee BJ, Kim YW. Antimicrobial activity and stability of stapled helices of polybia-MP1. *Arch Pharm Res*. 26 grudzień 2017;40(12):1414–9.
201. Jenner ZB, Crittenden CM, Gonzalez M, Brodbelt JS, Bruns KA. Hydrocarbon-stapled lipopeptides exhibit selective antimicrobial activity. *Peptide Science*. 25 maj 2017;108(3).
202. Mourtada R, Herce HD, Yin DJ, Moroco JA, Wales TE, Engen JR, i in. Design of stapled antimicrobial peptides that are stable, nontoxic and kill antibiotic-resistant bacteria in mice. *Nat Biotechnol*. 19 październik 2019;37(10):1186–97.
203. Wojciechowska M, Macyszyn J, Miszkiewicz J, Grzela R, Trylska J. Stapled Anoplin as an Antibacterial Agent. *Front Microbiol*. 13 grudzień 2021;12.
204. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*. 25 maj 2008;89(5):392–400.
205. Haiko J, Suomalainen M, Ojala T, Lähteenmäki K, Korhonen TK. Invited review: Breaking barriers — attack on innate immune defences by omptin surface proteases of enterobacterial pathogens. *Innate Immun*. 1 kwiecień 2009;15(2):67–80.
206. Ta L, Gosa L, Nathanson DA. Biosafety and Biohazards: Understanding Biosafety Levels and Meeting Safety Requirements of a Biobank. W 2019. s. 213–25.
207. Łoś JM, Golec P, Węgrzyn G, Węgrzyn A, Łoś M. Simple Method for Plating *Escherichia coli* Bacteriophages Forming Very Small Plaques or No Plaques under Standard Conditions. *Appl Environ Microbiol*. 15 sierpień 2008;74(16):5113–20.
208. Hrabák J, Empel J, Bergerová T, Fajfrlík K, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, i in. International Clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with Extended-Spectrum β -Lactamases in a Czech Hospital. *J Clin Microbiol*. październik 2009;47(10):3353–7.
209. Baraniak A. Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in Poland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 wrzesień 2002;50(3):393–6.
210. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, i in. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. sierpień 2000;406(6799):959–64.
211. Medeiros AA, O'Brien TF, Wacker WEC, Yulug NF. Effect of Salt Concentration on the Apparent In-Vitro Susceptibility of *Pseudomonas* and Other Gram-Negative Bacilli to Gentamicin. *Journal of Infectious Diseases*. 1 grudzień 1971;124(Supplement 1):S59–64.

212. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, i in. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*. 25 październik 2001;413(6858):852–6.
213. Soni I, Chakrapani H, Chopra S. Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announc*. 29 październik 2015;3(5).
214. Holden MTG, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NPJ, Enright MC, i in. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 29 czerwiec 2004;101(26):9786–91.
215. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, i in. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. listopad 1997;390(6657):249–56.
216. Zhong C, Gou S, Liu T, Zhu Y, Zhu N, Liu H, i in. Study on the effects of different dimerization positions on biological activity of partial d-Amino acid substitution analogues of Anoplin. *Microb Pathog*. luty 2020;139:103871.
217. Meinike K, Hansen P. Peptoid Analogues of Anoplin Show Antibacterial Activity. *Protein Pept Lett*. 1 wrzesień 2009;16(9):1006–11.
218. Libardo MDJ, Nagella S, Lugo A, Pierce S, Angeles-Boza AM. Copper-binding tripeptide motif increases potency of the antimicrobial peptide Anoplin via Reactive Oxygen Species generation. *Biochem Biophys Res Commun*. styczeń 2015;456(1):446–51.
219. Slootweg JC, van Schaik TB, Quarles van Ufford H (Linda) C, Breukink E, Liskamp RMJ, Rijkers DTS. Improving the biological activity of the antimicrobial peptide anoplin by membrane anchoring through a lipophilic amino acid derivative. *Bioorg Med Chem Lett*. lipiec 2013;23(13):3749–52.
220. Wang Y, Chen J, Zheng X, Yang X, Ma P, Cai Y, i in. Design of novel analogues of short antimicrobial peptide anoplin with improved antimicrobial activity. *Journal of Peptide Science*. 15 grudzień 2014;20(12):945–51.
221. Munk JK, Ritz C, Fliedner FP, Frimodt-Møller N, Hansen PR. Novel Method To Identify the Optimal Antimicrobial Peptide in a Combination Matrix, Using Anoplin as an Example. *Antimicrob Agents Chemother*. luty 2014;58(2):1063–70.
222. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Pharmaceuticals*. 20 wrzesień 2016;9(3):59.
223. Pasquina-Lemonche L, Burns J, Turner RD, Kumar S, Tank R, Mullin N, i in. The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*. 11 czerwiec 2020;582(7811):294–7.
224. Rajagopal M, Walker S. Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. W 2015. s. 1–44.
225. Boneca IG, Huang ZH, Gage DA, Tomasz A. Characterization of *Staphylococcus aureus* Cell Wall Glycan Strands, Evidence for a New β -N-Acetylglucosaminidase Activity. *Journal of Biological Chemistry*. kwiecień 2000;275(14):9910–8.
226. Ward JB. The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochemical Journal*. 1 czerwiec 1973;133(2):395–8.

227. Hayhurst EJ, Kailas L, Hobbs JK, Foster SJ. Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 wrzesień 2008;105(38):14603–8.
228. Vollmer W, Seligman SJ. Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.* luty 2010;18(2):59–66.
229. Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, i in. *Staphylococcus aureus* Resistance to Human Defensins and Evasion of Neutrophil Killing via the Novel Virulence Factor Mprf Is Based on Modification of Membrane Lipids with L-Lysine. *J Exp Med.* 7 maj 2001;193(9):1067–76.
230. Ernst CM, Peschel A. Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol Microbiol.* kwiecień 2011;80(2):290–9.
231. Nishi H, Komatsuzawa H, Fujiwara T, McCallum N, Sugai M. Reduced Content of Lysyl-Phosphatidylglycerol in the Cytoplasmic Membrane Affects Susceptibility to Moenomycin, as Well as Vancomycin, Gentamicin, and Antimicrobial Peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* grudzień 2004;48(12):4800–7.
232. Pham TK, Kim DH, Lee BJ, Kim YW. Truncated and constrained helical analogs of antimicrobial esculentin-2EM. *Bioorg Med Chem Lett.* grudzień 2013;23(24):6717–20.
233. Hirano M, Saito C, Yokoo H, Goto C, Kawano R, Misawa T, i in. Development of Antimicrobial Stapled Peptides Based on Magainin 2 Sequence. *Molecules.* 16 styczeń 2021;26(2):444.
234. Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE, Berg RH. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc.* 1 luty 1992;114(5):1895–7.
235. Nielsen PE, Egholm M. An Introduction to Peptide Nucleic Acid. *Curr Issues Mol Biol.* 1999;
236. Wojciechowska M, Równicki M, Mieczkowski A, Miskiewicz J, Trylska J. Antibacterial Peptide Nucleic Acids—Facts and Perspectives. *Molecules.* 28 styczeń 2020;25(3):559.
237. Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* grudzień 1999;1489(1):159–66.
238. Jasiński M, Miskiewicz J, Feig M, Trylska J. Thermal Stability of Peptide Nucleic Acid Complexes. *J Phys Chem B.* 3 października 2019;123(39):8168–77.
239. Demidov V V., Potaman VN, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchard O, Sönnichsen SH, i in. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol.* wrzesień 1994;48(6):1310–3.
240. Demidov V, Frank-Kamenetskii MD, Egholm M, Buchardt O, Nielsen PE. Sequence selective double strand DNA cleavage by Peptide Nucleic Acid (PNA) targeting using nuclease S1. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(9):2103–7.
241. Gasparello J, Manicardi A, Casnati A, Corradini R, Gambari R, Finotti A, i in. Efficient cell penetration and delivery of peptide nucleic acids by an argininocalix[4]arene. *Sci Rep.* 28 luty 2019;9(1):3036.
242. Vaara M, Porro M. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* sierpień 1996;40(8):1801–5.

243. Yavari N, Goltermann L, Nielsen PE. Uptake, Stability, and Activity of Antisense Anti-acpP PNA-Peptide Conjugates in *Escherichia coli* and the Role of SbmA. *ACS Chem Biol.* 19 marzec 2021;16(3):471–9.
244. Watanabe F, Bito T. Vitamin B12 sources and microbial interaction. *Exp Biol Med.* 7 styczeń 2018;243(2):148–58.
245. Pieńko T, Trylska J. Extracellular loops of BtuB facilitate transport of vitamin B12 through the outer membrane of *E. coli*. *PLoS Comput Biol.* 1 lipiec 2020;16(7):e1008024.
246. Di Girolamo PM, Bradbeer C. Transport of Vitamin B12 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* czerwiec 1971;106(3):745–50.
247. Noinaj N, Guillier M, Barnard , Travis J., Buchanan SK. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu Rev Microbiol.* 13 październik 2010;64(1):43–60.
248. White JC, DiGirolamo PM, Fu ML, Preston YA, Bradbeer C. Transport of vitamin B 12 in *Escherichia coli*. Location and properties of the initial B 12 -binding site. *J Biol Chem.* 10 czerwiec 1973;248(11):3978–86.
249. Cadieux N, Bradbeer C, Reeger-Schneider E, Köster W, Mohanty AK, Wiener MC, i in. Identification of the Periplasmic Cobalamin-Binding Protein BtuF of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* luty 2002;184(3):706–17.
250. James KJ, Hancock MA, Gagnon JN, Coulton JW. TonB Interacts with BtuF, the *Escherichia coli* Periplasmic Binding Protein for Cyanocobalamin. *Biochemistry.* 6 październik 2009;48(39):9212–20.
251. Friedrich MJ, de Veaux LC, Kadner RJ. Nucleotide sequence of the *btuCED* genes involved in vitamin B12 transport in *Escherichia coli* and homology with components of periplasmic-binding-protein-dependent transport systems. *J Bacteriol.* wrzesień 1986;167(3):928–34.
252. Locher KP, Lee AT, Rees DC. The *E. coli* BtuCD Structure: A Framework for ABC Transporter Architecture and Mechanism. *Science* (1979). 10 maj 2002;296(5570):1091–8.
253. Kandt C, Tieleman DP. Holo-BtuF stabilizes the open conformation of the vitamin B12 ABC transporter BtuCD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 15 luty 2010;78(3):738–53.
254. Ivetac A, Campbell JD, Sansom MSP. Dynamics and Function in a Bacterial ABC Transporter: Simulation Studies of the BtuCDF System and Its Components. *Biochemistry.* 1 marzec 2007;46(10):2767–78.
255. Pieńko T, Czarnecki J, Równicki M, Wojciechowska M, Wierzba AJ, Gryko D, i in. Vitamin B12-peptide nucleic acids use the BtuB receptor to pass through the *Escherichia coli* outer membrane. *Biophys J.* luty 2021;120(4):725–37.
256. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, i in. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 11 czerwiec 2002;99(12):7877–82.
257. Mattiuzzo M, Bandiera A, Gennaro R, Benincasa M, Pacor S, Antcheva N, i in. Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol Microbiol.* 28 październik 2007;66(1):151–63.

258. Zhou, Kang, Lihan Zhou, Qing 'En Lim, Ruiyang Zou, Gregory Stephanopoulos, and Heng-Phon Too. 2011. 'Novel Reference Genes for Quantifying Transcriptional Responses of Escherichia Coli to Protein Overexpression by Quantitative PCR'. BMC Molecular Biology 12(1):18. doi: 10.1186/1471-2199-12-18.