

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk



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

Klementyna Julia Marciniak

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej

Promotor: dr hab. Kamilla Grzywacz, prof. ICHB PAN

Poznań 2023



Rozprawa doktorska została wykonana w ramach uczestnictwa w projekcie *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”*, realizowanym wspólnie przez trzy jednostki:

- Politechnikę Poznańską,
- Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
- Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

w ramach Umowy o dofinansowanie nr POWR.03.02.00-00-I011/16.

Projekt *Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „NanoBioTech”* jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 – 2020.



Poznań 2023

Pragnę serdecznie podziękować

Dr hab. Kamilli Grzywacz, prof. ICHB PAN mojemu promotorowi

Za inspirację, naukę i mentorstwo

Pomoc oraz życzliwość w każdym wymiarze.

Dr hab. Markowi Żywickiemu, prof. UAM

Za wsparcie merytoryczne w realizacji pracy badawczej

Całemu Zakładowi Transkryptomiki Funkcjonalnej

Za niezapomniane chwile i niezwykle rozmowy

Kolegom i koleżankom pracującym w Centrum Zaawansowanych Technologii

Za rytuał spotkań w kuchni i wszelką pomoc sąsiedzką

Rodzinie

Za wsparcie i wyrozumiałość

Moim Rodzicom

1. Spis Treści

1. Spis Treści.....	5
1 Streszczenie	8
2 Wstęp	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	13
2.1.1 Szczep MRSA o obniżonej wrażliwości na wankomycynę Mu50.	14
2.1.2 Genetyka oporności na antybiotyki u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.	16
2.2 Struktura drugorzędowa RNA w kontroli ekspresji genów u bakterii.....	21
2.2.1 Dynamika struktury RNA jako źródło potencjału regulacyjnego.	21
2.2.2 Zmiana struktury drugorzędowej RNA w regulacji transkrypcji	26
2.2.3 Zmiana struktury drugorzędowej RNA w regulacji translacji.....	31
2.3 Ryboprzełączniki jako cele w antybiotykoterapii	36
3 Cel i Uzasadnienie Podjętej Tematyki Pracy.....	38
4 Materiały i metody.....	41
4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	41
4.2 Odczynniki	41
Enzymy	41
Antybiotyki	41
Pozostałe odczynniki	41
Zestawy	42
Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych	43
4.3 Startery i oligomery DNA	43
4.5 Protokoły	45
4.5.1 Warunki hodowli <i>Staphylococcus aureus</i>	45
4.5.2 Izolacja całkowitego RNA.....	45

4.5.3	Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym.....	47
4.5.4	Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych.....	47
4.5.5	Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego dla <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA w hodowli z wankomycyną.....	48
4.5.6	Wyznaczenie krzywej wzrostu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	49
4.5.7	Analiza aktywności metabolicznej <i>S. aureus</i>	49
4.5.8	Fracjonowanie rybosomów w gradiencie sacharozy.....	50
4.5.9	Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania Term – seq.....	51
4.5.10	Metoda PTT-quant.....	55
4.6	Aparatura.....	56
5	Wyniki i Dyskusja.....	57
5.1	Charakterystyka MRSA.....	57
5.1.1	Dobór i optymalizacja metody izolacji RNA.....	57
	Dyskusja do 5.1.1.....	61
5.1.2	Wyznaczenie minimalnego stężenia inhibującego dla wankomycyny.....	63
	Dyskusja do 5.1.2.....	65
5.1.3	Krzywa wzrostu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	67
5.1.4	Analiza aktywności metabolicznej <i>S. aureus</i>	68
5.1.5	Określenie zmian w aktywności translacyjnej <i>S. aureus</i> MRSA, będącej odpowiedzią na stres antybiotykowy.....	70
	Dyskusja do 5.1.4 i 5.1.5.....	72
5.2	Sekwencjonowanie metodą Term- seq.....	75
5.2.1	Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania Term-Seq.....	76
5.3	Analiza danych wysokoprzepustowych – Identyfikacja kandydatów na ryboprzełączniki.....	79
5.3.1	Ryboprzełącznik PABCT.....	82
5.3.2	Ryboprzełącznik MST.....	84
	Dyskusja do 5.3.1 i 5.3.2.....	85

5.3.3 Ryboprzełącznik MCAS	88
Dyskusja do 5.3.3.....	90
5.3.4 Ryboprzełącznik HSK	93
Dyskusja do 5.3.4.....	94
5.3.5 Ryboprzełącznik ASC.....	97
Dyskusja do 5.3.5.....	98
5.3.6 Ryboprzełącznik BA.....	100
Dyskusja do 5.3.6.....	101
5.3.7 Ryboprzełącznik DT	103
Dyskusja do 5.3.7.....	104
5.4 Weryfikacja biochemiczna aktywności potencjalnych ryboprzełączników w warunkach stresu antybiotykowego.	106
5.4.1 Kontrola cięcia transkryptów <i>ex vivo</i> z wykorzystaniem RNazy H	108
5.4.2 Ocena aktywności regulatorowej wybranych kandydatów na ryboprzełączniki.	111
5.4.3 Współczynnik indukcji kandydatów na ryboprzełączniki <i>S. aureus</i> MRSA podczas stresu antybiotykowego.	115
5.4.4 Dyskusja do 5.4.....	118
6. Podsumowanie	121
7 Wykaz skrótów	123
8 Spis Tabel, Rysunków i Równań.....	126
9 Referencje	133
10 Dorobek Naukowy.....	148

1 Streszczenie

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

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

(SAOUHSC_00167), Cukrowego transportera ABC, białka wiążącego ATP (SAOUHSC_00175), Podjednostki D kompleksu antyporterowego (SAOUHSC_00886), Kinazy homoseryny (SAOUHSC_01322), Komponentu pierwszego syntazy kwasu antranilowego (SAOUHSC_01366), Dwufunkcyjnej autolizyny (SAOUHSC_02023) oraz Transferazy dimetyloadenozynowej (SAOUHSC_00464). Zgodnie z najnowszą wiedzą wszystkie wskazane geny uwikłane są w powstawanie fenotypu wykazującego obniżoną wrażliwość na wankomycynę.

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

1 Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains pose a significant threat as common causes of bacterial infections in hospitals, often resistant to available antibiotics such as daptomycin, vancomycin, and linezolid. The continuous emergence of new MRSA isolates with no effective treatment options underscores the critical need to explore novel strategies to combat antibiotic-resistant strains, focusing on innovative mechanisms of action. RNA regulatory mechanisms, including attenuation and riboswitches, have emerged as promising targets for alternative therapies against drug-resistant bacteria. These mechanisms rely on structural changes in functional RNA regions, such as the ribosome binding site (RBS) and termination hairpins. Recent research has highlighted extensive alterations in non-coding RNA expression in response to antibiotic-induced stress in bacteria.

This doctoral research delves into the RNA-dependent regulatory mechanisms in MRSA during vancomycin-induced antibiotic stress, with a particular focus on identifying key components of the RNA regulatory network, namely riboswitches. We determined the threshold concentration of vancomycin at which noticeable adaptation processes occur and employed next-generation sequencing using the Term-seq method. This sequencing approach, designed to analyze regulatory mechanisms based on transcription termination events, involves adapter ligation to all natural 3' ends of mRNA, enabling the identification of full-length and truncated transcripts resulting from riboswitch activity. A comparative analysis of the transcriptomes from MRSA control cultures and those treated with 2 mg/l of vancomycin revealed seven potential riboswitch candidates. Secondary structure predictions were conducted for each identified regulator to validate their significance, followed by an analysis of the genes under their control. During adaptation stress to vancomycin, the activity of potential riboswitches modulating the expression of seven genes was confirmed, including Peptide ABC transporter, ATP – binding protein (SAOUHSC_00167), Multiple sugar-binding transport ATP-binding protein (SAOUHSC_00175), Monovalent cation/H antiporter subunit D (SAOUHSC_00886), Homoserine kinase (SAOUHSC_01322), Anthranilate Synthase Component I (SAOUHSC_01366), Bifunctional autolysin (SAOUHSC_02023) and Dimethyladenosine transferase (SAOUHSC_00464). According to current knowledge, all of these genes are implicated in the development of a phenotype characterized by reduced sensitivity to vancomycin.

Subsequently, we conducted biochemical verification of these findings using the PTT-quant method, which allows for the analysis of the transcriptional activity of genes potentially regulated by riboswitches and the absolute quantification of shortened and full-length transcripts. Our results confirmed the functionality of riboswitches under vancomycin stress for four out of the seven candidates. The induction coefficients for potential riboswitches located in the 5'UTR of mRNA were as follows: 2.01 for Peptide ABC transporter, ATP – binding protein (SAOUHSC_00167), 1.09 for Monovalent cation/H antiporter subunit D (SAOUHSC_00886), 3.18 for Homoserine kinase (SAOUHSC_01322), and 2.06 for Dimethyladenosine Transferase (SAOUHSC_00464). These findings highlight the significance of pursuing further research to leverage these identified regulatory mechanisms as novel targets in the development of alternative antibiotic therapies.

2 Wstęp

W toku ewolucji wszystkie rozprzestrzeniające się formy życia wykształciły mechanizmy umożliwiające jak najlepszą konkurencyjność w wyścigu o dostęp do składników odżywczych i terytorium. Wśród mikroorganizmów jedną z najbardziej efektywnych metod eliminacji konkurencji jest sekrecja antybiotyków, których różnorodność i szerokie spektrum działania skutecznie ogranicza wzrost i rozwój określonych organizmów.

Gdy Aleksander Fleming wygłaszał przemówienie z okazji otrzymanej Nagrody Nobla za odkrycie penicyliny G przestrzegał przed pochopnym i nieprzemysłanym stosowaniem antybiotyków ze względu na możliwość pojawienia się i szybkiego rozprzestrzeniania bakteryjnej oporności. Naturalną odpowiedzią na działanie czynnika hamującego jest wykształcanie przez mikroorganizmy mechanizmów umożliwiających jego neutralizację. Fakt ten sprawił, że po 50 latach powszechnego stosowania antybiotyków ludzkość mierzy się z kolejnym ogromnym zagrożeniem. Zgodnie z przedstawionym przez światową organizację zdrowia WHO pierwszym globalnym raportem z 2018 roku na temat antybiotykooporności, świat zmierza w kierunku ery postantybiotykowej, w której powszechne infekcje i drobne urazy skutecznie leczone od dziesięcioleci znów mogą być śmiertelne [1]. Rocznie problem ten dotyka aż 700 000 osób, które w wyniku niepowodzenia kuracji antybiotykowej ponoszą śmierć. Szacuje się, że po roku 2050 liczba ta wzrośnie do 10 milionów, co obecnie odpowiada rocznej liczbie zgonów z powodu chorób nowotworowych [2]. Poszukiwanie alternatywnych rozwiązań lub nowych leków przeciwdrobnoustrojowych stało się priorytetem, ale także ogromnym wyzwaniem stawianym przed naukowcami. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe została określona jako jeden z 10 największych globalnych zagrożeń zdrowia publicznego przed którym stoi ludzkość.

Jednymi z najbardziej obiecujących celów do walki z bakteriami opornymi na antybiotyki są mechanizmy regulatorowe RNA takie jak atenuacja (w kontekście ekspresji genów) czy ryboprzełączniki. Zasada ich działania polega na kontroli ekspresji genów poprzez rearanżację strukturalną funkcjonalnych regionów RNA. Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci powiązано te genetyczne jednostki regulatorowe z ujawnianiem się procesów opornościowych u bakterii. Klasycznym przykładem atenuacji związanej z ujawnianiem lekooporności jest kontrola ekspresji genu *ermC* zapewniającego oporność na makrolidy u gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Antybiotyk

wiążąc się z rybosomem powoduje zatrzymanie translacji w wyniku czego powstanie krótkiej ramki odczytu destabilizuje strukturę podwójnej spinki i powoduje uwolnienie miejsca RBS (ang. *ribosome binding site*) dla innych aktywnych translacyjnie rybosomów. Efektem tej regulacji jest powstawanie enzymu modyfikującego miejsce wiązania antybiotyku [3]. W sposób bardziej bezpośredni działają ryboprzełączniki. Inhibicja lub aktywacja ekspresji genu pod jego kontrolą związana jest ze zmianą struktury drugorzędowej uwarunkowanej związaniem niskocząsteczkowego metabolitu do specyficznego regionu tej struktury. W wyniku wysokoprzepustowej identyfikacji genów regulowanych przez przedwczesną terminację transkrypcji metodą Term-seq udało się zidentyfikować ryboprzełącznik wiążący linomycynę zlokalizowany w rejonie 5' nieulegającym translacji (5'UTR) mRNA kodującego transporter ABC warunkujący u *Listerii monocytogenes* odporność na ten lek. [4].

Kompleksowa charakterystyka mechanizmów regulatorowych RNA w bakteriach lekoopornych umożliwia identyfikację potencjalnych celów dla współczesnej medycyny i projektowanie nowych klas antybiotyków. Znakomitym potwierdzeniem, że ryboprzełącznik może stanowić skuteczny cel dla zahamowania infekcji jest związek PC1, którego związanie do ryboprzełącznika guaninowego skutecznie blokuje regulację genu *guaA* u *Staphylococcus aureus*, czego efektem jest zatrzymanie choroby powodowanej przez tę bakterię [5].

2.1 *Staphylococcus aureus* MRSA

W sporządzonym przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC) raporcie CDC's Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 (2019 AR Threats Report) dotyczącym utrzymującego się problemu antybiotykooporności w Stanach Zjednoczonych, metycylinooporny szczep gronkowca złocistego, MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) zostaje wymieniony jako poważne zagrożenie. Statystyki dla tego drobnoustroju plasują się w mocnej czołówce najniebezpieczniejszych zakażeń, zarówno szpitalnych jak i społecznych. W samym USA w 2017 roku śmierć z powodu zakażenia MRSA poniosło aż 10 600 osób, zaś koniecznej hospitalizacji poddało się 323 700 tysięcy. Koszty leczenia z tego samego roku przekroczyły 1,7 miliarda dolarów, stanowiąc tym samym największy udział nakładu przeznaczanego na walkę z wielolekoopornymi infekcjami [6]. Powszechne i intensywne stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych doprowadziło do częściowej utraty

kontroli nad weryfikacją zasadności ich użycia. Dotyczy to zarówno podstawowej jak i szpitalnej opieki zdrowotnej, a także weterynarii, tuczu zwierząt i produkcji roślinnej. Uważa się, że suma działań tego typu na przestrzeni ostatnich 50 lat wywarła znaczną presję selekcyjną na populacjach drobnoustrojów, promując szczepy zdolne do szybkiej adaptacji [7]. Zgodnie z tym, zagrożenie jakie niesie ze sobą niekontrolowane pogłębianie się kryzysu lekoopornościowego, pobudziło wysiłki mające na celu wgląd w genetykę i zidentyfikowanie determinanty kodującej oporność na antybiotyki. Obecnie nazwa MRSA przestaje oddawać prawdziwą naturę tych organizmów. To już nie tylko oporność na metycylinę, ale również na ponad 20 innych różnych związków przeciwdrobnoustrojowych w tym wankomycynę, zwaną lekiem ostatniej szansy [8].

2.1.1 Szczep MRSA o obniżonej wrażliwości na wankomycynę Mu50.

W 1996 roku w Japonii, zidentyfikowany został pierwszy izolat kliniczny *S. aureus* MRSA wykazujący obniżoną wrażliwość na wankomycynę. Stąd jego nazwa, VISA, pochodząca od "*vancomycin intermediate S. aureus*" lub GISA, od "*glycopeptide intermediate S. aureus*" (ten ostatni wykazywał obniżoną wrażliwość na teikoplaninę). Zainteresowanie wzbudził fakt powstawania subpopulacji o zróżnicowanej wartości minimalnego stężenia hamującego, MIC (ang. *minimum inhibitory concentration*), dlatego w literaturze można spotkać nazwą hetero-VISA lub hetero-GISA. Dla żadnej z tych subpopulacji szczepu nie wykryto genów, które mogłyby jednoznacznie warunkować oporność na glikopeptydy, jak ma to miejsce w przypadku oporności na metycylinę (gen *mecA* kontrolujący białko PBP2a) [9]. Nowo odkryty szczep, nazwany Mu50, poddano badaniom, które wykazały że ma on dwukrotnie grubszą ścianę komórkową (około 40 warstw peptydoglikanu) niż typowe szczepy MRSA oraz, że syntetyzuje kilkakrotnie więcej prekursorów mureiny [10]. Dzięki dalszym badaniom ustalono, że cechy te nie są wystarczające do zaistnienia oporności, a kluczowe zmiany zachodzą na wcześniejszym etapie biosyntezy ściany komórkowej. Analizy genomowe wskazały, że obszary zmian polegające głównie na substytucji pojedynczego nukleotydu dotyczą transportu komórkowego, metabolizmu węglowodanów oraz mechanizmów regulatorowych [11]. Różnice dotyczyły także genów związanych z cyklem przemian kwasów trójkarboksylowych *ascA*, *pykA*, *IctE* prowadzących do powstania pirogronianu, kluczowego składnika w syntezie GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc-pentapeptydu – budulca ściany komórkowej [12, 13]. Efektem wzmożonej syntezy prekursorów peptydoglikanu oraz transportu jest formowanie się ściany komórkowej o nietypowej strukturze. Cechą

charakterystyczną szczepu Mu50 jest pozbawiona reszty aminowej cząsteczka glutaminianu w pentapeptydzie mureiny co w konsekwencji uniemożliwia wytwarzanie przez transpeptydazę wiązania peptydowego pomiędzy L-Lys i grupą karboksylową glicyny łańcucha pentaglicynowego. Zmiana ta generuje powstanie peptydoglikanu o zmienionej strukturze przestrzennej. Obserwuje się zwiększoną ilość niezwiązanych dimerów D-alanino-D-alaninowych na końcach pentapeptydów oraz zmniejszone usieciwienie [14, 15, 16]. Wolne dimery nie ulegają wbudowaniu w strukturę peptydoglikanu, lecz dyfundują w trójwymiarowej przestrzeni sieci peptydoglikanu, stanowiąc tym samym pułapkę dla wankomycyny zanim dotrze ona do właściwego miejsca działania. Zmniejszone usieciwienie umożliwia przenikanie tego glikopeptydu i wychwytywanie cząsteczek antybiotyku zanim dotrą do miejsca polimeryzacji heterodimerów-(GlcNAc- β -(1,4)-MurNAc-pentapeptyd), zachodzącej na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Dodatkowo, uwięzione cząsteczki wankomycyny, które spośród wszystkich antybiotyków postrzegane są jako duże, stanowią zawadę przestrzenną dla kolejnych molekuł, mogących przenikać w głąb ściany [16, 17]. Jako cechę współwystępującą przy zwiększonej ilości wolnych dimerów D-Ala D-Ala i oporności na wankomycynę wymienia się również obniżenie aktywności białka wiążącego penicylinę, PBP4. Jest to transferaza acylo-serynowa uczestnicząca w procesie polimeryzacji tego dipeptydu.

Kolejny obszar dotknięty szeregiem zmian mających wpływ na wyrażanie się fenotypu VISA dotyczy obniżonej aktywności autolitycznej. Zgodnie z obserwacjami prowadzonymi na szczepach rosnących na podłożach z wankomycyną o stężeniu odpowiadającym dawce subinhibującej, komórki rosną jako bezpostaciowe skupiska, grona. Dokładniejsze analizy wykazały, że posiadają nierozdzieloną, amorficzną ścianę komórkową [18]. Równocześnie zaobserwowano zmniejszone stężenie antybiotyku w pobliżu wyrosłych kolonii, co stanowi potwierdzenie wcześniejszych wyników wskazujących na wbudowywanie wankomycyny w strukturę peptydoglikanu [19].

Globalnie, zmiany które dotyczą poziomu ekspresji mRNA u szczepów wrażliwych na wankomycynę VSSA (ang. *vancomycin susceptible S. aureus*) oraz opornych na wankomycynę, VISA, pozyskanych od tego samego pacjenta na różnych etapach długotrwałej terapii wankomycyną ujawniają, że powstawanie fenotypu VSSA jest procesem wielogenowym i niezwykle złożonym [20]. Porównanie wariantu wrażliwego na wankomycynę z wariantem średnio wrażliwym wykazało różnice w ekspresji co najmniej 224 genów. Obserwowane obniżenie poziomu syntezy mRNA

dotyczyło 169 genów, związanych przede wszystkim z metabolizmem podstawowym, syntezą białek powierzchniowych oraz wytwarzanymi toksynami i enzymami. Wzmoczoną ekspresję wskazano dla 55 genów związanych głównie z transportem komórkowym, metabolizmem węglowodanów, biosyntezą ściany komórkowej oraz globalnymi procesami regulacyjnymi. W toku analizy zidentyfikowano również geny, których ekspresja była odpowiednio 84- i 23-krotnie wyższa w przypadku wariantu VISA w porównaniu z wariantem wrażliwym, jednakże funkcje tych genów nie zostały dotychczas w pełni poznane.

Zaledwie 6 lat później w Michigan w USA wyizolowano pierwszy szczep MRSA, u którego oporność na wankomycynę oraz glikopeptydy wywołana była zdobyciem klastra genów *vanA* od bakterii z rodzaju *Enterococcus* [21]. Ekspresja genów w klastrze *vanA*, zlokalizowanym w transpozonie (*Tn1546*), prowadzi do zmodyfikowanej syntezy prekursorów peptydoglikanu, które są cząsteczką docelową leku. W rezultacie, zamiast wiązać się z D-alaniną-D-alaniną, wankomycyna wiąże się z obniżonym powinowactwem do D-alaniny-D-mleczanu lub D-alaniny-D-seryny [22]. Obserwacje te wskazały, że oporność na glikopeptydy może być uzyskiwana na dwa sposoby, spośród których każdy jest skuteczny. Z tego względu MRSA zyskał światową sławę jako superbakteria szpitalna (ang. *Superbug*).

2.1.2 Genetyka oporności na antybiotyki u *Staphylococcus aureus* MRSA.

Obserwowalne w laboratorium spontaniczne mutacje mogą występować z częstotliwością rzędu 10^{-6} do 10^{-8} na pojedynczą komórkę. Taki proces mutacji i selekcji doprowadził do powstania populacji bakterii opornych na antybiotyki. Dodatkową perspektywę dotyczącą ewolucji bakterii opornych uzyskano dzięki scharakteryzowaniu horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*) oraz elementów poza chromosomowego DNA. Obecnie uważa się, że większość przypadków występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe jest wynikiem nabywania dodatkowych elementów genetycznych, do grupy których zaliczane są plazmidy, ruchome elementy genetyczne (sekwencje insercyjne i transpozony) oraz wyspy genomowe. Elementy te zawierają już zintegrowane geny oporności na antybiotyki i przekazywane są za pomocą HGT nie tylko w obrębie jednego gatunku, ale także pomiędzy odrębnymi, pochodzącymi nawet z różnych rodzajów [13]. Spośród istniejących rodzajów horyzontalnego transferu genów, którymi są transdukcja, transformacja oraz koniugacja wszystkie zaobserwowane zostały laboratoryjnie u *S.*

aureus. Poszczególony udział każdego z nich w środowisku naturalnym pozostaje kwestia niejasną. Szczególnym elementem genetycznym w kontekście nabywania genów antybiotykooporności są plazmidy. Znajdujące się w ich obrębie sekwencje insercyjne umożliwiają całkowitą lub częściową rekombinację. Mogą stanowić wektor dla ruchomych elementów genetycznych zawierających geny oporności umożliwiając ich przeniesienie zarówno z jednego plazmidu na inny, jak i z plazmidu na miejsce w chromosomie bez udziału homologii genetycznej. Kumulacja wielu genów oporności na jednym plazmidzie lub ich obecność w obrębie transpozonu na chromosomie stanowi wyjaśnienie dla pojawienia się wielolekoopornych gronkowców [23, 24]. Dodatkową obserwacją wspólną dla bakterii wśród których częściej występuje oporność na antybiotyki jest rozmiar genomu wynoszący 2,5 Mb lub więcej, w przypadku *Staphylococcus aureus* jest to aż 2,8 Mb. Na tej podstawie zasugerowano, że zdolność danej bakterii do ewolucji w kierunku fenotypu wielolekooporności może być funkcją wielkości genomu [25]. Zgodnie z tą hipotezą organizmy z większymi genomami posiadają bardziej różnorodne dodatkowe elementy genetyczne oraz większą zdolność do mutacji kompensacyjnych zwiększających stabilność wprowadzonych insercji, transpozycji oraz rekombinacji w genomie. W przypadku powodzenia, takie mutacje kompensacyjne blokują powrót do wrażliwego fenotypu nawet przy braku selekcji, a zatem przyczyniają się do utrzymywania szczepów opornych.

Jednym z najbardziej charakterystycznych mobilnych elementów genetycznych u MRSA przekazywanym w trakcie HGT jest kasetta chromosomowa SCC*mec* (ang. *staphylococcal cassette chromosome mec*). Stanowi główny nośnik genów oporności na antybiotyki β -laktamowe *mec* (*mecA*, *mecB*, *mecC*) wraz z genami kontrolującymi ich ekspresję (*mecR1* i *mecI*). Zlokalizowany jest w pobliżu miejsca początku replikacji chromosomu w miejscu insercji *attB*. W jego skład wchodzi trzy podstawowe elementy. Pierwszym z nich jest kompleks genów *ccr* składający się z *ccrAB* i/lub *ccrC* otoczony ORF, następnie kompleks *mec* skomponowany z genów *mec*, sekwencji inercyjnej i otaczających ORF oraz trzeci element zwany regionem J (ang. *J region*). Kluczowy pod względem wielolekooporności jest kompleks *ccr* umożliwiający insercję dodatkowych genów oporności dzięki miejscu specyficznej rekombinacji *ccrAB* oraz *ccrC*. Miejsca specyficznej rekombinacji są wysoce rozpoznawalne wśród wszystkich szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. SCC*mec* wydaje się pełnić rolę rezerwuaru chromosomalnego do insercji dodatkowych determinantów oporności na antybiotyki wraz z elementami transpozycyjnymi. Tym sposobem MRSA może nabyć Tn554 kodujący oporność na

antybiotyki z grupy MLS (*erm[A]*) oraz spektynomycynę (*spc*) [26]. Jest to przykład sprawnej wymiany informacji genetycznej umożliwiającej szybką adaptację do zaistniałej presji środowiskowej związanej z antybiotykami oraz zanieczyszczeniem metalami ciężkimi takimi jak kadm (*cad*). Mobilny element genetyczny SCCmec raportowany jest jako kluczowy w ewolucji MRSA pod względem nabywania genów oporności [27].

Zidentyfikowane mechanizmy oporności na antybiotyki u MRSA reprezentują bardzo zróżnicowane modele znoszenia działania antybakteryjnego. Jednym ze sposobów jest produkcja specyficznych enzymów unieczyniających antybiotyków poprzez enzymatyczną degradację obejmującą hydrolizę grupy funkcjonalnej antybiotyku. Ten mechanizm *Staphylococcus aureus* MRSA wykorzystuje wobec antybiotyków β -laktamowych, w tym penicyliny. Wytwarzana zewnątrzkomórkowa β -laktamaza dezaktywuje antybiotyk poprzez hydrolizę pierścienia β -laktamowego. Gen β -laktamazy (*blaZ*) znajduje się transpozonach przenoszonych przez różnorodną grupę tzw. plazmidów oporności na metale ciężkie i β -laktamy. Ten rodzaj oporności obserwuje się także w stosunku do chloramfenikolu. Detoksykacja antybiotyku zachodzi przy udziale indukowalnego enzymu acetylotransferazie chloramfenikolu będącego produktem genu *cat* znajdującego się na plazmidzie pC221 [28].

Kolejny wzorzec molekularny opiera się na zmianie struktury białka docelowego antybiotyku. Ten mechanizm aktywowany jest na przykład w stosunku do antybiotyków z grupy półsyntetycznych penicylin i cefalosporyn wobec których aktywność β -laktamaz jest nieskuteczna. Produkt białkowy genów *mec* znajdujących się w kasecie chromosomowej SCCmec koduje białko PBP2a wykazujące obniżone powinowactwo względem antybiotyku. Model uniemożliwiający działanie leku przez zmiany strukturalne białka docelowego reprezentuje również oporność na kwas fusydowy. Mutacje chromosomalne w *fusA*, genie kodującym czynnik elongacyjny EF-G, niezbędny czynnik translacji wymagany do translokacji peptydów oraz recyklingu rybosomów, generują modyfikacje blokujące związanie z antybiotykem. Oporność na kwas fusydowy jest także przejawiana przez aktywność pompy efluksowej. Usuwanie ksenobiotyków poprzez ich wypompowanie poza komórkę [29].

Aktywny transport antybiotyków ma swój szczególny udział w kontekście wielolekooporności. Geny związane z transportem aktywnym ksenobiotyków poza komórkę są szeroko identyfikowane w plazmidach oporności wielolekowej, takich jak pSK1 [30]. Mechanizm ten może istnieć samodzielnie, jednakże w ogromnej większości przypadków wykazuje działanie synergistyczne do pozostałych [31]. Obecność pomp

wyływowych predysponuje bakterie do rozwinięcia stanu antybiotykooporności z tolerancji. Przykładem wspomaganej ewolucji przez pompy wyływowe jest oporność na cyproflaksynę u *S. aureus*. Spośród 222 izolatów hodowanych w obecności antybiotyku oporność rozwinęła się u tych z podwyższoną ekspresją *norA*, jednym z najlepiej przebadanych u gronkowców genem kodującym pompę wyływową. Nadekspresja *norA* doprowadziła do wyższych wskaźników mutacji wśród genów kodujących topoizomerazę IV oraz gyrazę DNA, będących celem dla antybiotyków z grupy fluorochinolonów [32].

Odwrotnym mechanizmem redukcji wnikania antybiotyku jest zapobieganie tworzenia biofilmu. Oba te mechanizmy, jak wynika z obecnie przeprowadzanych badań, są współzależne. W silnie tworzącym biofilm izolacie klinicznym *S. aureus* wyizolowano geny, które po wyciszeniu powodowały wadliwe tworzenie biofilmu. Jeden ze scharakteryzowanych (*bfd2*) kodujący hipotetyczne białko, wykazuje wszystkie cechy pompy wyływowej należącej do MFS (ang. *major facilitator superfamily*), jednej z pięciu nadrodziny pomp efluksowych związanych z opornością wielolekową. Badania wykazały również, że MgrA, regulator plejotropowy u *S. aureus*, działa jako negatywny regulator pomp efluksowych NorB i NorC135, a jednocześnie hamuje tworzenie się biofilmu [34]. Kolejne badania wykazujące związek pomiędzy tymi mechanizmami opornościowymi donoszą, że względne poziomy ekspresji genów pompy efluksowej *mdeA*, *norB* i *norC* należących do rodziny MFS były podwyższone w trakcie tworzenia się biofilmu. Pompy wyływowe NorB i NorC mogą eksportować cetrymid, bromek etydydny oraz chinolony [35, 36] .

Powodzenie wykształcenia się oporności na antybiotyki to najczęściej wynik synergistycznego działania zazębiających się szlaków metabolicznych [37]. W Tabeli 1 przedstawione zostały wybrane udokumentowane determinanty oporności. Zestawienie to uwidacznia różnorodność występowania mechanizmów opornościowych w przypadku bakterii *Staphylococcus aureus*.

Antybiotyk	Determinant oporności	Mechanizm oporności	Lokalizacja	Element genetyczny
Biocydy	<i>qacA</i> , <i>qacB</i> , <i>qacC</i>	wielolekowe pompy wypływowe	Plazmid	pSK1 pSK23 pSK41
Bleomycyna	<i>ble</i>	białko wiążące bleomycyne	Plazmid, Chromosom	pUB110
Chloramfenikol	<i>cat</i>	acetylotransferaza chloramfenikolu	Plazmid	pC221
	<i>cfr</i>	metylotransferaza 23S rRNA	Chromosom	IS21-558
Fluorochinolony	<i>glaA/B</i>	topoizomeraza DNA IV	Chromosom	-
	<i>gyrA/B</i>	gyraza DNA		
	<i>norA</i>	wielolekowe pompy wypływowe		
Kwas fusydowy	<i>fusA</i>	czynnik elongacyjny EF-G	Chromosom	-
	<i>fusB</i>	detoksyfikacja	Plazmid	Pub101
Gentamycyna, Kanamycyna	<i>aacA-aphD</i>	N-acetylotransferaza 6'-aminoglikozydu; 2"-aminoglikozydowa fosfotransferaza	Plazmid::Transpozon Chromosom::Transpozon	Tn4001
Linezolid	geny 23S rRNA	23S rRNA	Chromosom	-
Metacylina, Oksacylina	<i>mecA</i>	PBP2a	Chromosom::SCC	SCC <i>mec</i>
Grupa MLS	<i>erm(A)</i>	rRNA N-6-metylotransferaza adeninowa	Chromosom::Transpozon (SCC <i>mec</i>)	Tn554
	<i>erm(B)</i>		Plazmid::Transpozon	Tn551
	<i>erm(C)</i>		Plazmid	pE194
Streptogramina A	<i>vga(A)</i>	pompa wypływowa (ABC) z nadrodziny MLS	Plazmid	pIP524
	<i>vga(B)</i>			pIP1633
	<i>vat(A)</i>	acetylotransferaza wirginiamycyny		pIP680
	<i>vat(B)</i>			pIP524
Streptogramina B	<i>vgb(A)</i>	liaza streptograminy B	Plazmid	pIP524
Mupirocyna	<i>ileS</i>	syntetaza izoleucylo-tRNA	Plazmid	pIP524
	<i>ileS-2</i>	syntetaza izoleucylo-tRNA	Chromosom	-
Neomycyna, kanamycyna	<i>aphA-3</i>	fosfotransferaza aminoglikozydowa	Chromosom::Transpozon	Tn5404
	<i>aadD</i>	adenylotransferaza aminoglikozydowa	Plazmid	pUB110
Penicylina	<i>blaZ</i>	β -laktamaza	Plazmid::Transpozon, Plazmid::Chromosom	Tn552
	<i>mecA</i>	PBP2a	Chromosom::SCC	SCC <i>mec</i>
Ryfampicyna	<i>rpoB</i>	podjednostka β polimerazy RNA	Chromosom	-

Spektynomycyna	<i>spc</i>	adenylotransferaza spektynomycyny	Chromosom::Transpozon	-
Streptomycyna	<i>str</i>	adenylotransferaza spektynomycyny	Plazmid	pS194
	<i>sat4</i>	acetylotransferaza streptomycyny	Chromosom::Transpozon	Tn5405
Tetracyklina	<i>tetA(K)</i>	antyporter tetracykliny (pompa wypływowa)	Plazmid, Chromosom::Plazmid	pT181
	<i>tetA(L)</i>		Plazmid	pKKS2187
	<i>tetA(M)</i>	rybosomalne białko protekcyjne	Chromosom::Transpozon	Tn5801
Trimetoprim	<i>dfrA</i>	reduktaza	Plazmid	pSK639
	<i>dfrB</i>	dihydrofolianowa	Chromosom	-
Wankomycyna, Teikoplanina	<i>vanHXYZ</i>	oporność na glikopeptydy	Plazmid::Transpozon	Tn1546

Tabela 1. Zestawienie wybranych genetycznych determinantów oporności na antybiotyki u *Staphylococcus aureus*. ABC: *ATP-binding cassette superfamily*; MFS: *Major facilitator superfamily*

2.2 Struktura drugorzędowa RNA w kontroli ekspresji genów u bakterii

Szybka adaptacja bakterii do zmieniających się warunków środowiskowych jest możliwa dzięki dynamicznej regulacji ekspresji genów. Spośród mechanizmów najszybszym i najbardziej efektywnym jest wykorzystanie regulatorów opartych o zmianę struktury RNA. Jedną z właściwości kwasów rybonukleinowych jest zdolność do tworzenia złożonych struktur poprzez interakcje pomiędzy odległymi regionami, a także pomiędzy nukleotydami znajdującymi się blisko siebie [38]. Oddziaływania te mogą tworzyć motywy łączy i pętli zarówno w formie *cis* jak i *trans*, a także wysoce ustrukturyzowane pseudowęzły, zamki rybozowe czy motywy typu *k-turns* [39]. Dzięki różnorodności motywów strukturalnych możliwa jest kontrola większości etapów ekspresji genów poczynając od transkrypcji, poprzez translację, aż do rozpadu RNA [40].

U prokariota poszczególne regiony helikalne, zwłaszcza regiony nieulegające translacji 5' (ang. *5' untranslated regions*, 5' UTR) są krytyczne dla kontroli transkrypcji i translacji poprzez modulację sygnałów dla polimerazy RNA oraz rybosomu [41, 42]. Przykładem złożonych struktur w tym regionie są aptamery ryboprzełączników, które pod wpływem cząsteczek sygnałowych ze środowiska generują zmiany wzorców strukturalnych, aby sekwestrować lub ujawniać elementy regulacyjne [43].

2.2.1 Dynamika struktury RNA jako źródło potencjału regulacyjnego.

Ustrukturyzowanie zapewnia cząsteczkom RNA wszechstronność, która przejawia się w prostych interakcjach parowania zasad, aż po tworzenie kieszeni

wiążących kationy (np. Mg^{2+} , K^+), złożone metabolity (np. witaminy, koenzymy, pochodne nukleotydów, aminokwasy), a nawet białka [44]. Przemiany jakim ulega dana struktura RNA polegają na stabilizacji bądź destabilizacji w skali mikrosekund co w większości przypadków przekłada się na współistnienie obu form w konkretnym momencie [45]. Dynamika ta zapewnia ogromny potencjał regulacyjny.

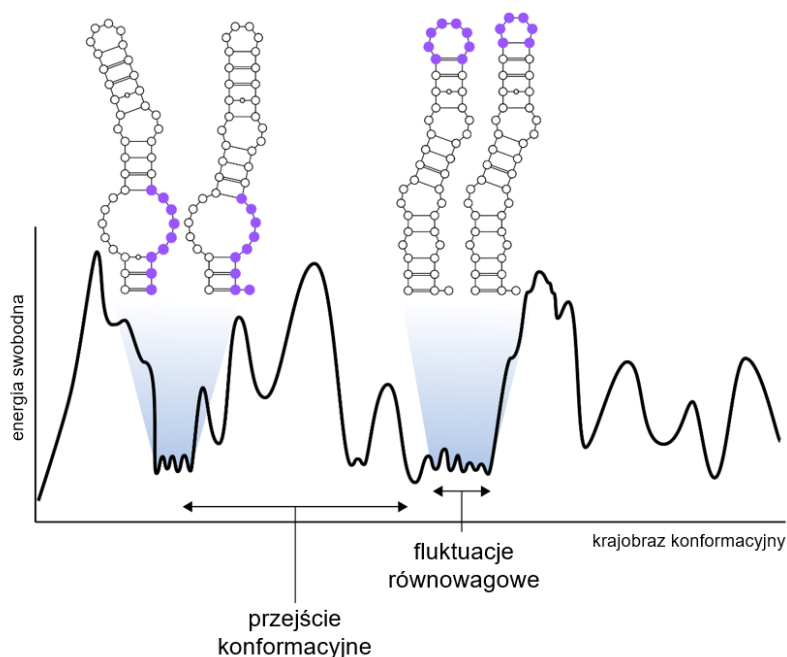
2.2.1.1 Energia swobodna RNA

Układ przestrzenny cząsteczek RNA determinowany jest interakcjami występującymi w obrębie pojedynczej nici, pomiędzy odrębnymi nićmi, a także otaczającym środowiskiem. Tendencją tworzenia się konkretnej struktury drugorzędowej jest minimalizacja energii swobodnej Gibbsa, jednakże nie oznacza to występowania danej sekwencji RNA w jednym korzystnym układzie energetycznie [46]. Pojedyncza struktura RNA reprezentowana jest przez rozkład licznych konformacji możliwych do utworzenia w danym wzorcu sekwencyjnym. Każda z konformacji, nazywana strukturą pośrednią posiada swoją energię swobodną, która wraz z współwystępującymi tworzy krajobraz energetyczny danej puli cząsteczek RNA [47]. Obserwowalnym zjawiskiem jest występowanie dysproporcji z przesunięciem ilościowym w kierunku struktur stabilnych termodynamicznie o niskiej energii swobodnej. Struktury o zbliżonej energii swobodnej tworzą minima energetyczne – suboptymalne struktury wyodrębniające się na tle pozostałych. Ponieważ niektóre konformacje w danym układzie sekwencyjnym nie mogą osiągnąć odpowiedniej stabilności energetycznej, dana populacja cząsteczek RNA zdominowana jest przez kilka, a pozostałe są raczej niestabilnymi formami pośrednimi [48].

2.2.1.2 Rodzaje dynamiki konformacyjnej RNA

Definiuje się dwa rodzaje dynamiki RNA: fluktuacje równowagowe oraz przejścia konformacyjne (Rysunek 1). Pierwszy z nich odnosi się do ciągłych i spontanicznych zmian konformacyjnych wśród zgodnych sekwencyjnie cząsteczek RNA o zbliżonej energii swobodnej. Szybkość tych fluktuacji zależy od poziomu bariery energetycznej oddzielającej konformacje. Obserwowane spontaniczne przejścia zachodzą w przypadku cząsteczek RNA, w których alternatywne zwijanie oddzielone jest niską barierą energetyczną. Cząsteczki reprezentowane przez dwa układy konformacyjne istnieją w równowadze strukturalnej 50:50, aż do przesunięcia równowagi przez związanie czynnika stabilizującego przez jedną ze struktur [48].

Przejście konformacyjne zachodzi wówczas, gdy sygnały pochodzące z komórki jak zmiana stężenia metabolitów lub temperatura przesuwają energię swobodną struktury do poziomu, w którym następuje przegrupowanie i rozwinięcie konkretnego regionu RNA [49]. W rezultacie zbiór konformacji zostaje przetasowany, a nowy wzór przestrzenny staje się dostępny. Stabilizacja nowej konformacji trwa do czasu uwolnienia czynnika oddziałyującego, kiedy to cząsteczki powracają do stanu równowagi sprzed [50].



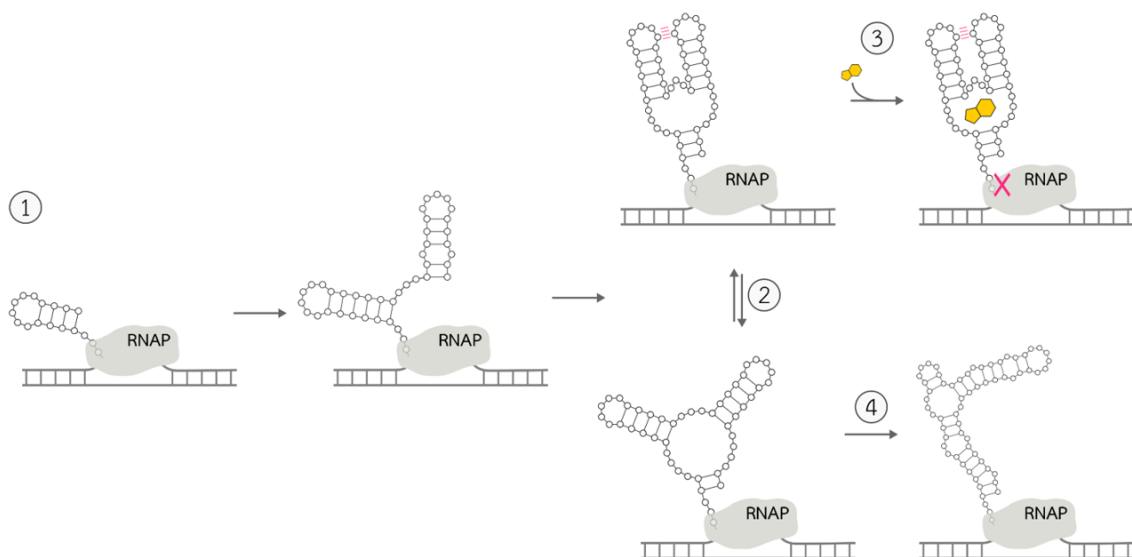
Rysunek 1. Krajobraz konformacyjny RNA. Szczególne przykłady konformacji strukturalnej pokazano dla dwóch minimów energetycznych. Różnice pomiędzy strukturami w obrębie jednego minima energetycznego pokazano kolorem fioletowym.

2.2.1.3 Fałdowanie ko-transkrypcyjne.

We wczesnych latach 80' zaobserwowano, że struktura drugorzędowa RNA tworzy się w obrębie powstającej nici jeszcze w czasie trwania transkrypcji. Tworzące się oddziaływania w czasie rzeczywistym stymulują przechodzenie przez poszczególne poziomy energetyczne i układy konformacyjne. Fałdowanie ko-transkrypcyjne zachodzi w kolejności sekwencyjnej tworzącej się nici od końca 5' do 3' zanim prawdziwy koniec 3' zostanie zsyntetyzowany (Rysunek 2).

Zgodnie z wnioskowaniem Schroeder i innych [51] na temat fałdowania RNA w czasie transkrypcji wskazuje się na 3 implikacje. Po pierwsze, lokalne interakcje nowo zsyntetyzowanego RNA są uwarunkowane kierunkiem procesu transkrypcji. Po drugie bezpośredni wpływ na fałdowanie RNA ma szybkość zachodzenia procesu transkrypcji.

Uwarunkowaniem jest różnica prędkości z jaką polimeraza RNA syntetyzuje nowo powstającą nić. Szybkość polimerazy bakteryjnej wynosi około 20-80 nukleotydów na sekundę, a tempo fałdowania RNA mieści się w przedziale od 10 - 100 milisekund do nawet minut lub godzin w przypadku konformacji uwięzionych kinetycznie [52]. Jako trzecią implikację fałdowania RNA w czasie transkrypcji wskazuje się sam proces jej wstrzymania. Interakcja występująca pomiędzy aparatem transkrypcyjnym polimerazy, syntetyzowanym RNA, a obecnością lub brakiem czynnika białkowego indukuje konkretną konformację przestrzenną tworzącej się struktury [53, 54, 55]. Przykładem wskazanej zależności konformacyjnej jest aktywność ryboprzełącznika mononukleotydu flawinowego FMN znajdujący się w operonie *ribDEAHT* u *Bacillus subtilis*. Pod wpływem związania metabolitu następuje stabilizacja jednej z dwóch możliwych konformacji ko-transkrypcyjnych w wyniku czego nowo powstała spinka terminacyjna wstrzymuje działanie polimerazy [56].



Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie fałdowania kotranskrypcyjnego ryboprzełącznika. (1) Fałdowanie wstępne końca 5' RNA podczas transkrypcji. (2) Aptamer ryboprzełącznika może przybierać dwie struktury konformacyjne. (3) Jeden z nich stabilizowany przez wiązanie ligandu. (4) Brak związania ligandu, struktura drugorzędowa podlega dalszym zmianom konformacyjnym wraz z syntezą RNA, RNAP – polimeraza RNA.

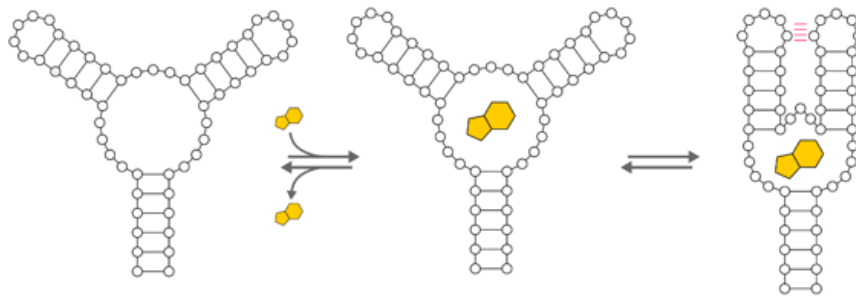
2.2.1.4 Dynamika strukturalna ryboprzełączników

Ryboprzełączniki są wysoko ustrukturyzowanymi regionami RNA, które biorą udział w regulacji *cis* transkrypcji oraz translacji. Zlokalizowane w regionie liderowym mRNA, 5' UTR, powyżej kodonu start i charakteryzują się wysokim zakonserwowaniem ewolucyjnym w królestwie Bakterii, Archebakterii, a nawet Eukariota [57]. Ich funkcją jest pełnienie roli receptorów dla małych cząsteczek sygnałowych (ligandów). Związanie

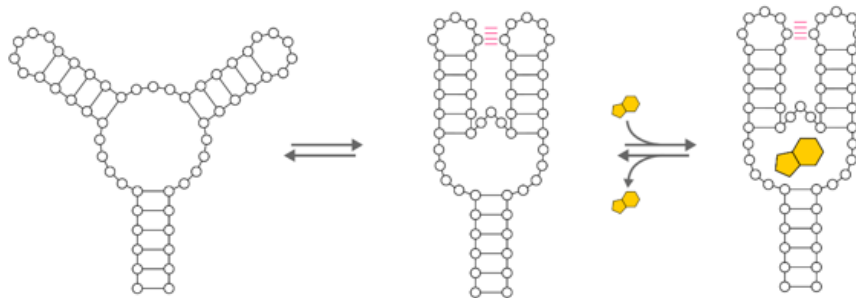
ligandu przez obszar zwany aptamerem ryboprzełącznika, indukuje rearanżację strukturalną platformy ekspresyjnej znajdującej się poniżej aptameru. Zmiany te uruchamiają jeden z kilku mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę ekspresji genów. W swojej ostatniej pracy Scull i współpracownicy [58] opisali dwa modele opisujące rodzaj związania ligandu (Rysunek 3). Pierwszy z nich zwany selekcją konformacyjną występuje, gdy związanie ligandu poprzedza jedna z dwóch zmian konformacji aptameru lub ich ewentualna forma pośrednia. W tym scenariuszu związanie ligandu stabilizuje jedną z dwóch dynamicznie zmieniających się konformacji i generuje odpowiedź regulatorową przez zmiany w platformie ekspresyjnej. Przykładem tej regulacji jest ryboprzełącznik wykrywający fluor. Zaobserwowano, że fałdowanie ryboprzełącznika w obecności fluoru reprezentuje jedną strukturę, niezależnie od jego stężenia. Jednakże w przypadku jego braku obserwowalna jest krótkotrwała konformacja pośrednia z dostępnym miejscem wiązania ligandu zwana „stanem wzbudzonym”. Wiązanie fluoru nawet w wąskim zakresie stężeń stabilizuje strukturę, inicjuje zmiany konformacyjne w platformie ekspresyjnej.

Drugi alternatywny model opisujący dynamikę wiązania ligandu nazwany został mechanizmem indukowanego dopasowania. Występuje gdy związanie ligandu ma miejsce przed zaistnieniem zmiany konformacyjnej. Przykładem tego mechanizmu dopasowania jest ryboprzełącznik purynowy reagujący na wewnątrzkomórkowe stężenie guaniny. Konformacyjnie dynamiczny stan bez związanego ligandu początkowo stabilizowany jest przez parowanie zasad typu Watson-Crick między ligandem a resztą pirymidynową (Y74). Dopiero w następstwie obserwuje się przegrupowanie pętli J2/3 i zamknięcie ligandu w strukturze potrójnego węzła [59]. Niektóre ryboprzełączniki wykorzystują oba mechanizmy jak na przykład transkrypcyjny ryboprzełącznik preQ1 u *Bacillus subtilis*. Faworyzowanym modelem jest selekcja konformacyjna, w której ligand wiąże się z już powstałą, wybraną konformacją. Jednak przy niskim stężeniu ligandu i jonów Mg^{2+} obserwuje się mechanizm dopasowania indukowanego, w którym zmiana konformacyjna zapoczątkowana jest związaniem metabolitu [58].

dopasowanie indukowane



selekcja konformacyjna



Rysunek 3. Mechanizmy wiązania ligandu i stabilizacji konformacji ryboprzełącznika. Dopasowanie indukowane zakłada, że zmiana konformacyjna aptameru wynika z wiązania ligandu. W selekcji konformacyjnej wiązanie ligandu stabilizuje dynamicznie zmieniającą się konformację aptameru.

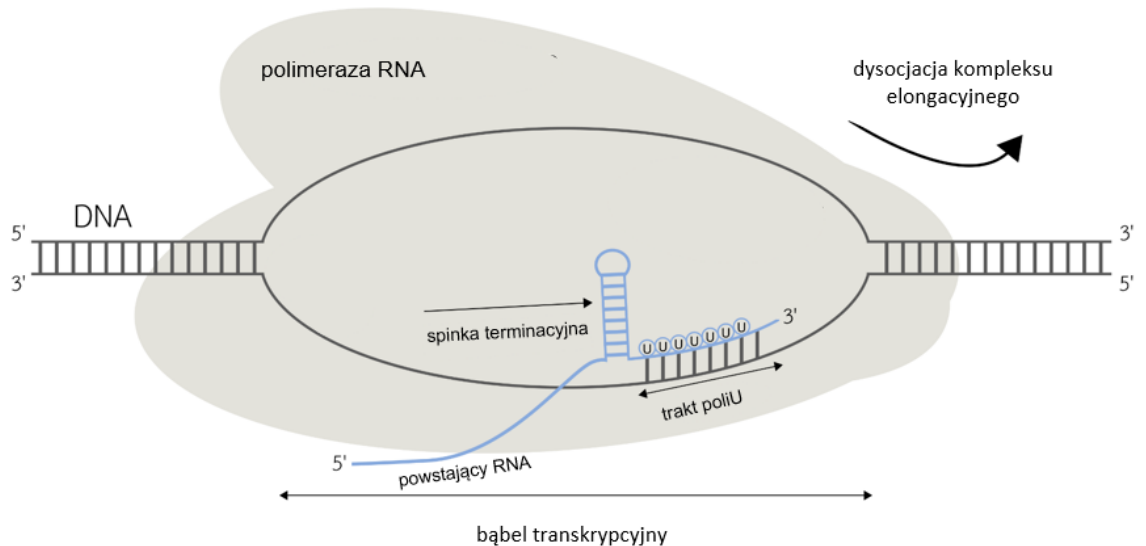
2.2.2 Zmiana struktury drugorzędowej RNA w regulacji transkrypcji

Zmiana struktury RNA odgrywa szczególną rolę w odniesieniu do terminacji transkrypcji. Prawidłowy przebieg tego procesu umożliwia recykling polimerazy RNA (RNAP), zapobiegający transkrypcji sąsiednich genów i kolizjom z innymi kompleksami transkrypcyjnymi. W genomach bakteryjnych wyróżnia się dwa rodzaje przebiegu tego procesu. Pierwszy z nich opiera się wyłącznie na interakcji pomiędzy RNAP a sekwencją matrycy DNA i jest to tak zwana terminacja wewnętrzna lub Rho-niezależna. Druga natomiast zależna jest od interakcji z określonymi czynnikami, takimi jak białka Rho lub Mfd.

2.2.2.1 Wewnętrzna terminacja transkrypcji.

Wewnętrzna terminacja transkrypcji jest możliwa dzięki tworzeniu się struktur spinki terminacyjnej bogatej w G-C, w powstającej cząsteczce RNA, w odległości 7-9 nukleotydów powyżej końca 3' RNA [60, 61]. Istotną cechą tego regionu jest występowanie traktu poliU tuż za spinką terminacyjną o długości około 7-9 nukleotydów,

głównie urydynowych (49-51). Utworzenie spinki terminacyjnej powoduje chwilowe zatrzymanie RNAP co jednocześnie zbiega się z w czasie z transkrypcją traktu poliU. Wstrzymanie w miejscu niestabilnego heterodupleksu poliU (RNA) z poliA (DNA) zapoczątkowuje rozplecenie nici, destabilizację kompleksu elongacyjnego i uwolnienie nowopowstałej nici RNA (Rysunek 4) [61].



Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie wewnętrznej terminacji transkrypcji u bakterii. Zatrzymanie polimerazy RNA przez napotkany trakt poliU, po którym następuje utworzenie spinki terminatora w powstającej cząsteczce RNA, powodując destabilizację i dysocjację kompleksu elongacyjnego.

Dyskusja na temat cech opisanych wyżej jest wciąż żywa. Wątpliwościom podlega stopień, w którym mechanizm ten jest ewolucyjnie zakonserwowany we wszystkich bakteriach, większość badań opiera się na *Escherichia coli*, *B. subtilis* i tylko kilku innych gatunkach. Wciąż u ogromnej liczby bakterii zmiana struktury drugorzędowej RNA w regulacji terminacji transkrypcji potrzebuje potwierdzenia. Ahmad i współpracownicy wykazali, że trakt poliU po spince terminacyjnej może nie być wymagany do skutecznego przebiegu zakończenia elongacji, a znaczna liczba zidentyfikowanych terminatorów nie posiada kanonicznej sekwencji nukleotydowej w postaci ciągu powtórzeń uracylu na powstających transkryptach. Badacze podejrzewają, że pobliskie sekwencje nukleotydowe znajdujące się w kanale wyjściowym RNAP, miejscu aktywnym czy kanale DNA mogą również być determinantą pauzowania polimerazy RNA [61].

Opisane zostały także inne potencjalne mechanizmy destabilizacji RNAP. Model hipertranslokacji (ang. *hypertranslocation model*) w przód zakłada, że po terminacji RNAP kontynuuje swoje działanie w poprzek nici DNA, ale bez wydłużania powstałej

cząsteczki RNA, co skutkuje skróceniem hybrydy RNA:DNA i destabilizuje kompleks elongacyjny [62]. Kolejny mechanizm, zwany modelem ścinającym (ang. *shearing model*) opisuje proces w którym spinka terminatora powoduje “poślizg” kompleksu elongacyjnego TEC (ang. *transcription elongation complex*) i zerwanie wiązania heterodupleksu RNA:DNA [63]. Zaproponowanym modelem jest także model allosteryczny (ang. *allosteric model*), którego koncepcja polega na zmianie konformacyjnej w strukturze kompleksu elongacyjnego przez oddziaływanie pomiędzy kanałem wyjścia RNA, a terminatorem. Konsekwencją jest destabilizacja i oddysocjowanie poszczególnych podjednostek TEC [64].

Zgodnie z założeniem, wewnętrzna terminacja transkrypcji nie wymaga dodatkowych czynników aby skutecznie wywołać oddysocjowanie RNAP. Jednakże zgodnie z prowadzonymi obserwacjami, białko NusA może istotnie wzmacniać terminację transkrypcji poprzez wydłużenie pauzowania polimerazy RNA. Pośrednie miejsce oddziaływania zachodzi pomiędzy spinką terminacyjną, a podjednostką α , β oraz β' polimerazy RNA [65]. Jak wykazali Modal i współpracownicy istnieje znaczna liczba słabych i niekanonicznych terminatorów wewnętrznych, których skuteczność jest silnie zależna od NusA [66]. Z kolei odwrotny wpływ wywiera obecność białek NusG, NusB czy NusE, a także białka Q i N faga λ pełniących funkcję antytermiancyjną. Są to jak dotąd jedne z najszerzej przebadanych czynników mogących stymulować przebieg wewnętrznej terminacji transkrypcji.

2.2.2.2 Rho-zależna terminacja transkrypcji.

Procesy terminacji zależne od Rho i Mfd należą do odrębnej klasy zdarzeń transkrypcyjnych. W przeciwieństwie do terminacji wewnętrznej mechanizmy te zależne są od czynników pomocniczych takich jak translokazy Rho lub Mfd. Terminacja zależna od Mfd poświęcona jest recyklingowi kompleksu elongacyjnego. Związanie z RNAP i sąsiadującą sekwencją DNA inicjuje translokację zablokowanego kompleksu prowadząc do uwolnienia powstającej cząsteczki RNA i oddzielenia RNAP od matrycy DNA [61]. Rho to homoheksameryczna helikaza, zachowana konserwatywnie w królestwie bakterii z wyjątkiem kilku linii do których należą: *Mollicutes*, *Cyanobacteria* i niektóre gatunki z klas *Clostridia* i *Bacilli*. Szacuje się, że czynnik ten bierze udział w znacznej liczbie zdarzeń terminacji u *E. coli*. Washburna i Gottesman w swojej pracy stwierdzają, że około 20% transkryptów powstało przy udziale tego mechanizmu, zaś Mitra i współpracownicy wskazują, że przy udziale tego czynnika

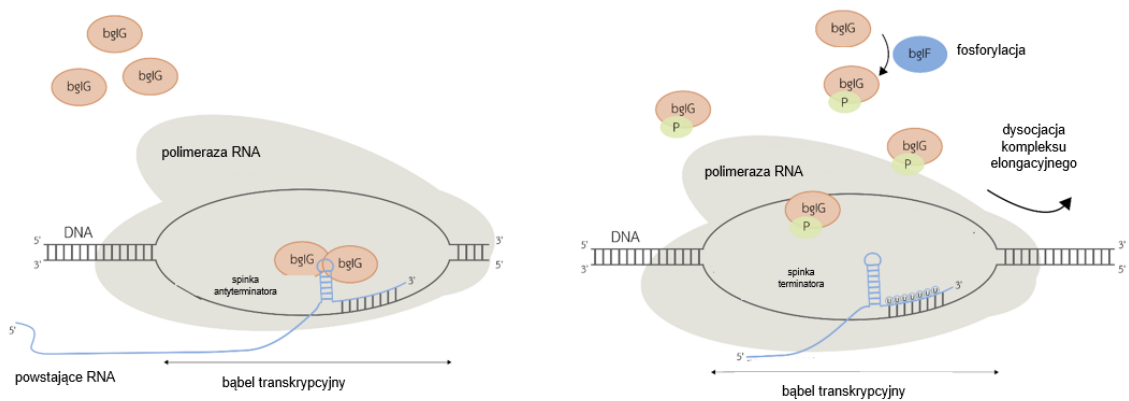
zachodzi aż 50% wszystkich zdarzeń terminacji transkrypcji. Warunkiem do jej zaistnienia jest obecność miejsca *rut* (ang. *Rho utilization site*), sekwencji bogatej w pirymidynę o długości 60-90 nukleotydów nieposiadającej szczególnej struktury drugorzędowej [60, 61]. Po związaniu z miejscem *rut* aktywność translokazy Rho inicjowana jest przez hydrolizę ATP indukując jej ruch w kierunku końca 3' cząsteczki RNA. Terminacja wywołana jest „złapaniem” kompleksu elongacyjnego i zatrzymaniem w miejscu sekwencyjnie zdefiniowanym zwanym miejscem uwalniania (ang. *release site*) [67]. Zdarzenie terminacji transkrypcji, w której pośredniczy Rho, jest czasami indukowana przez zmiany w strukturze RNA wywołane aktywnością różnych elementów regulatorowych w tym także ryboprzełączników [68].

2.2.2.3 Terminatory warunkowe

Niektóre spośród zidentyfikowanych mechanizmów terminacji transkrypcji wywołują ten proces warunkowo w odpowiedzi na czynniki środowiskowe. Szeroko opisaną grupą reprezentującą ten model regulacji ekspresji genów są ryboprzełączniki. Warunkowe zakończenie transkrypcji genu lub operonu, znajdującego się pod kontrolą ryboprzełączników jest następstwem związania konkretnego ligandu, rearanżacji strukturalnej oraz utworzenia bądź rozerwania struktury typu spinki pełniącej funkcję terminatora lub antyterminatora [69]. Nawiązując do ostatniego zdania z rozdziału 2.2.2.2 przykładem wywołanej terminacji transkrypcji przy udziale Rho jest aktywność ryboprzełącznika kontrolującego ekspresję genu *mgtA* u bakterii *Salmonella enterica*, którego ligandem jest jon magnezu Mg^{2+} . Hollands i współpracownicy wskazali, że przy niskim stężeniu kationu region RNA fałduje się, zamykając miejsce *rut* w strukturze drugorzędowej promując ekspresję genu. Jednak jego wysoki poziom indukuje odmienne fałdowanie, a miejsce *rut* staje się dostępne dla białka Rho [68]. Opisany został także alternatywny mechanizm regulatorowy genu *mgtA*. Wariant ten zakłada modulację przez szybkość z jaką zachodzi translacja w związku z obecnością bogatego w prolinę, wrażliwego na obecność jonów Mg^{2+} białka liderowego MgtL. W tym modelu zatrzymanie rybosomu przez niskie stężenie jonów magnezu jest głównym powodem zmian strukturalnych i uwolnienia miejsca *rut*. Oba opisane mechanizmy uczestniczą w kontroli ekspresji genu *mgtA* [70].

Analogiczny model działania do ryboprzełącznikami dzielą atenuatory. Cechą różnicującą te mechanizmy jest przyczyna zmiany konformacyjnej prowadzącej do

terminacji transkrypcji. W przypadku atenuatorów, rearanżacja strukturalna może zostać wywołana pauzowaniem rybosomu, białkami wiążącymi RNA, a także nieaminoacylowanym tRNA. Przykładem atenuacji jest mechanizm regulatorowy operonu *bgl* u *E. coli*. Białka wiążące RNA, będące jednocześnie produktem operonu *bgl* u *E. coli* są kluczowe dla jego regulacji. Ich ekspresja jest silnie zależna od β -glukozydów, a pod ich nieobecność białko *bglF* fosforyluje i sekwestruje białko *bglG* (w obecności substratu można zaobserwować odwrotny proces defosforylacji). Fosforylowana *bglG* nie jest zdolna do wiązania rybonukleinowych miejsc antyterminatorowych w powstającym RNA, gdzie wiadomo, że blokuje tworzenie wewnętrznych terminatorów, które inaczej byłyby obecne w operonie, poprzez stabilizację kompetycyjną struktury drugorzędowej [71] (Rysunek 5).



Rysunek 5. Regulacja operonu *bgl* u *E. coli*. W przypadku braku β -glukozydów (prawa strona), białko *bglF* fosforyluje i sekwestruje białko *bglG*. Fosforylowane białka nie mogą wiązać miejsca antyterminatora i blokować tworzenie się wewnętrznego terminatora, co można zaobserwować, gdy obecne są β -glukozydy, a białka *bglG* nie są fosforylowane (lewa strona).

Przykładem regulacji transkrypcji przez zatrzymanie rybosomu jest mechanizm kontrolujący operon tryptofanowy *trp* w *E. coli*. Atenuatorem *sensu stricto* jest poprzedzający właściwy operon tryptofanowy element liderowy (ang. *lider transcript*) *trpL* składający się z czterech różnych segmentów. Każda para znajdująca się obok siebie może utworzyć strukturę spinki terminacyjnej (1 z 2, 2 z 3 i 3 z 4). Pierwszy segment od końca 5' częściowo pokrywa się z krótką ramką odczytu zawierającą kodony Trp. Struktura spinki utworzona z pierwszych dwóch segmentów działa jak terminator wstrzymując proces transkrypcji. Niskie stężenie tryptofanu w komórce powoduje opóźnienie translacji kodonów Trp wraz z regionem liderowym, podczas gdy transkrypcja zachodzi do końca operonu. Zablokowany rybosom zapobiega tworzeniu się pierwszej struktury terminatora co indukuje składanie segmentów 2 i 3 w spinkę pełniącą

funkcję antyterminatora. W odwrotnej sytuacji wysokich stężeń tryptofanu (a właściwie Trp-tRNA^{Trp}) rybosom przyspiesza translację obejmując segment 1 oraz 2, co skutkuje utworzeniem się wewnętrznej spinki terminacyjnej z segmentów 3 i 4. W tym wariacie dalsza transkrypcja genów zostaje wstrzymana [71].

Bezpośrednimi regulatorami *cis* biorącymi udział w warunkowej terminacji transkrypcji genów związanych z metabolizmem aminokwasów są nieaminoacylowane tRNA [72]. Struktury mRNA wiążące cząsteczki tRNA nazywane są ryboprzełącznikami T-box i występują najliczniej wśród bakterii gram dodatnich. Uczestniczą w regulacji poziomu aminokwasów w komórce poprzez wykrywanie nieaminoacylowanych tRNA. Budowa elementu T-box zawiera trzy struktury spinek połączonych pętlą centralną oraz pseudowęzłem [73]. Rozpoznanie właściwego tRNA możliwe jest dzięki pętli wewnętrznej spinki I zawierającej sekwencje specyfikatora (ang. *specifier sequence*) oddziałującej z antykodonem konkretnego tRNA. Pętla II (nieobecna we wszystkich strukturach T-box) służy do tworzenia dodatkowych wiązań pomiędzy mRNA a tRNA, co wpływa na wzmocnienie powstałych interakcji w pętli I [72]. Elementem, którego funkcja ma znaczący wpływ na działanie T-boxu jest pętla III zaangażowana w stabilizację struktury antyterminatora, wymaganej do prawidłowego wykrywania aminoacylacji. Dzięki sekwencji konsensusowej 5'-UGGN-3' może oddziaływać na zassie komplementarności z ramieniem akceptorowym NCCA, tym samym wykrywać osadzenie aminokwasu na cząsteczce tRNA. Obsadzone aminokwasem ramię akceptorowe tRNA uniemożliwia interakcję pomiędzy wybrzuszeniem w strukturze antyterminatora i skutkuje powstaniem alternatywnej struktury drugorzędowej, powodującej terminację transkrypcji. Na stabilizację kompleksu wpływa również oddziaływanie, tworzące się pomiędzy ramionami D i T cząsteczki tRNA, a pętlą apikalną i wybrzuszeniem (ang. *bulge*) spinki I [73].

2.2.3 Zmiana struktury drugorzędowej RNA w regulacji translacji

Ścisła kontrola syntezy białek jest wymagana zarówno w stałych jak i zmiennych warunkach środowiskowych w celu utrzymania ich właściwego poziomu dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Translacja jako najbardziej energochłonny proces zachodzący w komórkach podlega regulacji w celu minimalizacji nakładów energetycznych na każdym etapie, zarówno przy inicjacji translacji, wydłużaniu, terminacji, a także przy recyklingu rybosomów [74]. Kluczowym etapem utworzenia aktywnego kompleksu translacyjnego jest etap izomeryzacji, prowadzący do

przekształcenia niestabilnego kompleksu preinicjacyjnego w stabilny kompleks inicjacyjny złożony z podjednostki rybosomu 30S, mRNA oraz tRNA^{fMet}. Proces ten jest nieodwracalny, a jego wydajność zależy od stosunku kinetyki izomeryzacji i fałdowania struktury mRNA [75, 76]. Najczęściej wykorzystywane i najskuteczniejsze mechanizmy regulacji translacji opierają się o modulację dostępności strukturalnej miejsca zdefiniowanego sekwencją Shine-Dalgarno (SD) oraz miejsca wiązania rybosomu RBS [77]. Mechanizmy regulatorowe RNA można podzielić na działające w układzie *cis* oraz *trans*.

2.2.3.1 Regulatory translacji działające w układzie *cis*.

Termosensory oraz ryboprzełączniki są najbardziej ubikwistycznymi przedstawicielami struktur regulatorowych RNA działających w układzie *cis*. Trzy klasy genów bakteryjnych podlegają kontroli zależnej od temperatury, są nimi geny zjadliwości oraz szoku termicznego ciepła i zimna. W procesie translacji termosensory działają poprzez sekwestrację miejsca RBS w strukturze drugorzędowej reagującej na wahania temperaturowe.

Regulatory te działają poprzez dwa mechanizmy. Pierwszy z nich, tryb suwakowy (ang. *zipper mode*), opiera się na rozpleceniu struktury typu spinka maskującej sekwencję SD oraz miejsce RBS, które po rozfałdowaniu stają się dostępne dla podjednostki rybosomu [78, 79, 80, 81]. Drugi, zwany trybem przełączenia (ang. *switching mode*), opiera się na przejściu pomiędzy konformacjami, które sekwestrują lub rozplatają sekwencję SD oraz miejsce RBS [79]. Tryb pierwszy zidentyfikowano u patogenicznej bakterii *Listeria monocytogenes*. Rozwinięcie infekcji u gospodarza następuje na skutek mechanizmu przełączenia się bakterii z aktywności saprofitycznej na patogenną. Temperatura ciała gospodarza wywołuje rozplecenie struktury typu spinka uwalniając maskowane wcześniej miejsce wiązania rybosomu. Następuje aktywacja translacji białka PrfA, głównego regulatora wirulencji [48, 82]. Przykład termosensora reprezentującego tryb przejścia konformacyjnego znaleziony został w fagu λ enterobakterii. Zmiana temperatury stabilizuje strukturę A lub B, gdzie forma A zapobiega syntezie białka cIII promując u bakteriofaga zajście cyklu litycznego. Aktywacja termosensora wyzwalana jest również spadkiem temperatury. Reakcją na stres zimna u *E.coli* jest przegrupowanie strukturalne, w wyniku którego uwolnione zostaje miejsce RBS ze struktury typu spinki umożliwiając rozpoczęcie syntezy białka szoku zimna A (CspA) [79].

Nieco bardziej złożonymi regulatorami translacji są ryboprzełączniki. Podobnie jak termosensory RNA, kontrolują etap inicjacji poprzez modulację dostępności strukturalnej miejsc wiązania rybosomu. Do zaistnienia tego zjawiska niezbędne jest związanie określonego ligandu wyzwalającego tworzenie alternatywnych struktur, które odpowiednio sekwestrują bądź eksponują sekwencję Shine-Dalgarno. Regulacja translacji na skutek działania ryboprzełączników jest częściej spotykana u bakterii Gram-ujemnych. Stanowi to opozycję w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, wśród których ryboprzełączniki stanowią dominującą grupę regulatorów transkrypcji [83]. Według klasyfikacji Breakera można wyróżnić trzy grupy ryboprzełączników pod względem lokalizacji. Pierwszy z nich dotyczy regulatorów, w których miejsce wiązania rybosomu RBS jest nieodłączną częścią aptameru, tak więc ligand i rybosom konkurują o jego wiązanie. Przykładem jest mechanizm działania ryboprzełącznika wiążącego kobalaminę, gdzie przy wysokim stężeniu ligandu następuje wyhamowanie translacji. Drugi typ reprezentują ryboprzełączniki, w których domeny wiążące ligand i miejsce wiązania rybosomu są oddzielone. Przedstawicielem tego mechanizmu jest jeden z najbardziej rozpowszechnionych ryboprzełączników wiążących pirofosforan tiaminy, TPP. Po związaniu TPP z aptamerem następuje rearanżacja części platformy ekspresyjnej zawierającej RBS. Ostatnią grupę reprezentującą trzeci typ ryboprzełączników można również wskazać wśród regulatorów wiążących pirofosforan tiaminy. W tym przypadku obserwuje się dwuetapowy system regulacyjny, w którym RBS znajduje się w strukturze spinki terminatora. Jej utworzenie zależy od wysokiego stężenia ligandu, który poprzez skuteczne wiązanie z aptamerem zapobiega transkrypcji. Jednakże w przypadku umiarkowanego stężenia i utworzenia transkryptu pełnej długości występuje regulacja po transkrypcyjna, polegająca na ponownym utworzeniu struktury typu spinka zawierającej RBS [84].

Innym przykładem mechanizmu wykorzystującego ryboprzełączniki w warunkowej regulacji translacji jest degradacja mRNA. U bakterii Gram-dodatnich, takich jak *B. subtilis*, zaobserwowano że obecność glukozamino-6-fosforanu (GlcN-6-P) wzmaga aktywność rybozomu znajdującego się regionie 5'UTR genu kodującego właśnie glukozamino-6-fosforan. Obecność GlcN-6-P w środowisku wywołuje degradację mRNA przez aktywację RNazy J1 obniżając tym sposobem poziom jego produkcji [85].

Struktura drugorzędowa RNA wpływa na modulację translacji poprzez wprowadzanie zmian w prędkości poruszania się rybosomu na nici mRNA. Zwiększona

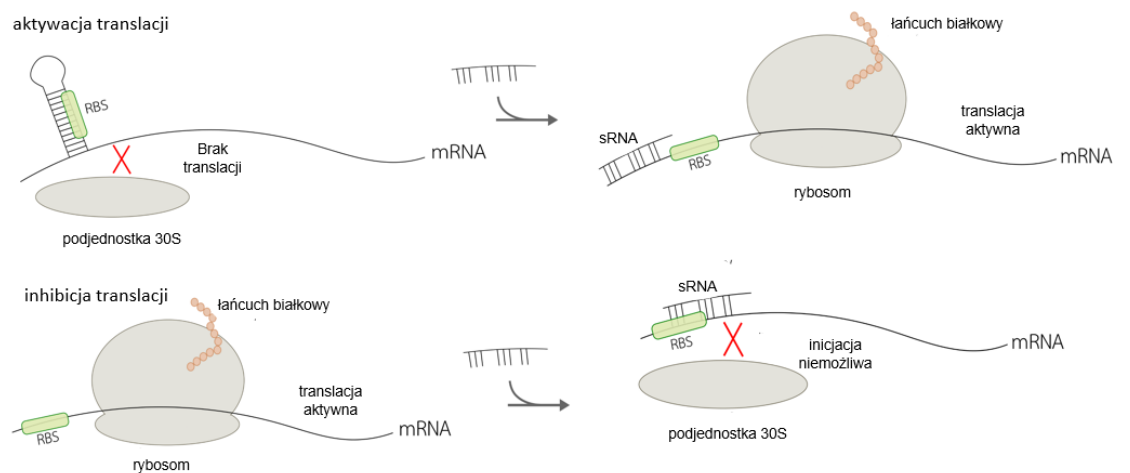
pauza rybosomu prowadzi do niższej wydajności syntezy danego białka, ponieważ czas potrzebny na pojedynczą translację wydłuża się. Ponieważ rybosomy posiadają aktywność helikazy mogą odkształcać strukturę drugorzędową mRNA, stąd przerwa podczas translacji jest raczej tymczasowa. Przerwy mogą prowadzić do znaczących zmian wydajności, wówczas gdy pauza ma miejsce na polisomach, a kolejkowanie dotyczy wielu rybosomów na pojedynczej nici mRNA. Takie kolizje rybosomów są rozpoznawane przez białko RqcH będące częścią systemu kontroli jakości rybosomów i wyznacza powstający łańcuch białkowy do degradacji przez proteazę ClpXP [74].

W proces regulacji translacji zaangażowane są także struktury wyższego rzędu jak G-kwadrupleksy. Te bogate w guaniny motywy strukturalne pierwotnie zidentyfikowane zostały w DNA. Mogą związać się w co najmniej dwa ułożone przyległe G-kwartety (cztery guaniny połączone wiązaniami) stabilizowane przez jony potasu (K^+). Ta sama struktura jest również tworzona przez RNA (rG4), które jak wynika z ostatnich badań można znaleźć u wielu bakterii, a ich rozkład jest szczególny dla poszczególnych gatunków. Obecnie prowadzone badania wskazują na powiązanie tych motywów strukturalnych z regulacją procesów metabolicznych i kontrolą ekspresji genów u *E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa* [86].

2.2.3.2 Regulatory translacji działające w układzie *trans*.

Regulacja translacji zależna od RNA może również zachodzić w układzie *trans*. Mechanizm ten spełniany jest poprzez wiązanie produktów ekspresji innych genów, w tym białek i niekodujących RNA [74]. W obu przypadkach efekt regulatorowy wywołany jest poprzez pośrednie lub bezpośrednie maskowanie regionu RBS czynnikami oddziałującymi. Regulacja translacji zależna od białek może zostać wywołana przez ich związanie w pobliżu sekwencji Shine-Dalgarno wpływając na dostępność wybranego transkryptu dla podjednostki rybosomu 30S. W przypadku niekodujących RNA - ncRNA (ang. *non-coding RNA*), efekt regulatorowy wywołany jest na zasadzie interferencji. Komplementarność z ich docelowym mRNA zazwyczaj nie jest doskonała, dlatego utworzony heterodupleks posiada plastyczność i dynamikę nie odbiegającą od większości pozostałych interakcji występujących pomiędzy RNA:RNA. Oddziaływanie RNA w układzie *trans* zakłóca proces translacji przez maskowanie miejsca wiązania rybosomu, blokując jego zdolność do tworzenia kompleksu inicjacyjnego (Rysunek 6). Transkodowane krótkie RNA (ang. *small RNA*, sRNA) mogą także zapobiegać tworzeniu się struktur maskujących RBS i w ten sposób pozytywnie

regulować translację. Krótkie bakteryjne RNA stanowią najczęstszą grupę takich regulatorowych ncRNA [83, 81]. Jednym z pierwszych opisanych regulatorowych ncRNA był MicF RNA, sRNA występujący u *E. coli*, którego działanie hamuje translację OmpF – głównej poriny błony zewnętrznej poprzez interferencję, a tym samym maskowanie RBS. Jednak regulacja oparta na ncRNA może również pośredniczyć w propagowaniu zachodzenia dynamicznych zmian strukturalnych w obrębie docelowego mRNA. Przykładem takich ncRNA jest SR1, sRNA, który wiąże się 100 par zasad poniżej miejsca startu mRNA *ahrC* u *B. subtilis*, aktywatora operonów katabolizmu argininy. Wiązanie indukuje zmiany w obrębie sekwencji Shine-Dalgarno mRNA *ahrC*, blokując tym samym miejsce wiązania rybosomu RBS [87].



Rysunek 6. Przykłady regulacji translacji działających w układzie trans. Regulatorowe sRNA kontrolują ekspresją genów pośrednio poprzez odsłonięcie miejsca RBS lub bezpośrednio, poprzez maskowanie regionu RBS.

Dynamiczna natura cząsteczek RNA w powiązaniu z procesami transkrypcji i translacji daje bardzo szeroki zakres możliwych mechanizmów regulatorowych. Wiedza na temat roli struktury drugorzędowej RNA w regulacji ekspresji genów stale się rozwija dostarczając wielu pomysłów stanowiących podstawę nowatorskich terapii lub medycyny alternatywnej.

2.3 Ryboprzełączniki jako cele w antybiotykoterapii

Mechanizmy regulatorowe RNA, w tym głównie ryboprzełączniki stanowią niezwykle obiecującą klasę celów terapeutycznych. Fakt ich występowania niemal wyłącznie w bakteriach i udział w regulacji zarówno podstawowych jak i specyficznych funkcji życiowych jest mocną podstawą w poszukiwaniu rozwiązań dla naglących problemów, w tym antybiooporności [88]. Kolejnym istotnym aspektem dotyczącym tych rozważań są mechanizmy rozwoju oporności. Bakterie pozyskują lub rozwijają oporność na antybiotyki za pomocą mechanizmów, które podzielić można wedle trzech kategorii; i) minimalizowanie stężenia wewnątrzkomórkowego, ii) modyfikacja celu molekularnego, iii) dezaktywacja antybiotyku poprzez hydrolizę lub modyfikację [89]. Dla związków ukierunkowanych na ryboprzełączniki zaobserwowano jedynie drugi spośród wymienionych modeli nabywania oporności, co nadaje kontekst istotności w kwestii ich liczby [90]. Przypuszcza się, że bakterie u których ryboprzełączniki regulują więcej niż jeden niezbędny klaster genów powinny mieć stosunkowo niski współczynnik występowania oporności FOR (ang. *frequency of resistance*). Wymagałoby to od bakterii uzyskania mutacji w wielu *locus* jednocześnie co wydaje się być mało prawdopodobne.

Spośród przeprowadzonych badań w tym obszarze uwagę skierowano na ryboprzełącznik FMN. Jest to regulator genów odpowiedzialnych za syntezę i transport ryboflawiny, a sam mononukleotyd flawinowy stanowi grupę prostetyczną enzymów biorących udział w reakcjach typu redoks. Rozeoflawina znana pod nazwą RoF jest związkiem wytwarzanym przez bakterie typu *Streptomyces davawensis* i jest jak dotąd jedynym znanym naturalnym związkiem bakteriobójczym wycelowanym w ryboprzełącznik FMN [91]. Jak większość aktywności laboratoryjnych w dziedzinie biotechnologii obserwacja ta również stała się inspiracją do poszukiwania analogów ryboflawiny, jednak o szerszym spektrum działania oraz niższej toksyczności z zachowaniem specyficzności wobec ryboprzełącznika FMN. Spośród przetestowanych związków szczególnie obiecujący okazał się być 5FDQD [92]. Misją w projektowaniu i syntezie tego związku było poszukiwanie alternatywy dla antybiotyków starszej generacji jak wankomycyna lub metronidazol stosowanych przeciwko infekcjom wywołanych przez bakterię *Clostridium difficile*. Zaprojektowany związek miał stać się remedium na zbyt szerokie spektrum działania obecnych antybiotyków, czego konsekwencją jest zubożenie mikrobioty jelitowej [93]. 5FDQD poddany został testom *in vivo* oraz *in vitro* ze względu na zadowalające parametry fizyko-chemiczne, jak: stała

dysocjacji, okres półtrwania czy sposób wiązania do ryboprzełącznika [92]. Uzyskano satysfakcjonujące wyniki, wskazujące na skuteczność 5FDQD porównywalną z wankomycyną, a jednocześnie efekt terapeutyczny osiągnąć był znacznie wcześniej. Redukcja patogennej bakterii na modelu mysim wyniosła 99,9% w zaledwie 4 godziny. Ogromnym atutem okazała się być nienaruszona bioróżnorodność współistniejącej mysiej mikrobioty jelitowej.

Rozgłos z w tej dziedzinie uzyskał zsyntetyzowany przez firmę Merck & Co związek o nazwie Ribocil, którego celem molekularnym także jest ryboprzełącznik FMN [94]. W przypadku tego związku wiązanie do ryboprzełącznika genu *ribB* następuje z wysokim powinowactwem, wynoszącym aż 6,6 nM. Wartość ta jest szczególnie zaskakująca w odniesieniu do K_d natywnego ligandu osiagającego 1,2 nM. Z przeprowadzonych testów *in vivo* ustalono, że już przy stężeniu 0,3 μ M obserwuje się inhibicję wzrostu bakterii z rodzaju *E. coli*, natomiast 2 μ g/ml tego związku wyznacza graniczną wartość minimalnego stężenia inhibującego. Dodatkowo, właściwości bakteriobójcze Ribocilu zostały wykazane wobec bakterii patogennych jak *Acinetobacter baumannii* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Efekt wyciszający infekcję uzyskany ze stosowania tego związku na modelu mysim jest porównywalny z tym osiąganym po zastosowaniu terapii antybiotykiem cyproflaksyną. Kwestią odbiegającą od założeń projektowanych związków mających oddziaływać z ryboprzełącznikami jest fakt, że Ribocil nie jest strukturalnym analogiem FMN. W efekcie nie inhibuje innych szlaków metabolicznych, w regulacji których uczestniczą ryboprzełączniki FMN. Badania, który nowe światło było potwierdzenie skuteczności działania Ribocilu jak i RoF w zwalczaniu infekcji wywołanych opornym na metycylinę szczepem *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococcus pyogenes*, a także *Enterococcus faecalis* [95]. Wykazane zostało synergistyczne działanie obu związków w niezależnej inaktywacji szlaków metabolicznych umożliwiającym zaopatrzenie komórki w ryboflawinę, niezbędnego kofaktora dla przeżycia bakterii.

3 Cel i Uzasadnienie Podjętej Tematyki Pracy

Za cel pracy obrałam dwa szczegółowe zadania badawcze :

- 1) Charakterystyka indukowanych w odpowiedzi na stres antybiotykowy zmian w aktywności transkrypcyjnej, translacyjnej oraz regulatorowej opornego na metycylinę szczepu gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA.**
- 2) Identyfikacja kluczowych komponentów sieci regulatorowej RNA, takich jak ryboprzełączniki, o wysokim potencjale terapeutycznym w kontekście antybiotykoterapii MRSA.**

Jednym z najpowszechniejszych drobnoustrojów lekoopornych monitorowanych przez WHO jest oporny na metycylinę szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA. Ta Gram-dodatnia bakteria jest jednym z głównych czynników związanych z zakażeniami szpitalnymi. Przez wiele lat za podstawowy lek przeciwko zakażeniom gronkowcem uważano metycylinę będącą penicyliną oporną na działanie β -laktamaz. Działanie tego antybiotyku polega na blokowaniu białek PBP (ang. *penicillin binding protein*), biorących udział w syntezie peptydoglikanu – jednej z podstawowych substancji ściany komórkowej. *S. aureus* oporność uzyskuje zwykle poprzez nabycie genu *MecA*, kodującego białko wiążące penicylinę, PBP-2a. Choć metacylina, flukloksacylina, dokloksacylina lub nafcylina mogą hamować działanie innych białek PBP normalnie występujących u *S. aureus*, oporne na działanie metycyliny białko PBP-2a uzupełnia ich działanie, umożliwiając bakteriom wzrost w obecności tych antybiotyków. Dodatkowo, wiele szczepów nabyło oporność na inne powszechnie stosowane grupy antybiotyków (na drodze spontanicznej mutacji lub poziomego transferu genów), a wśród nich i) amoksycylina, ampicylina, penicylina benzylova, ii) fluorochinolony i tetracykliny, iii) gentamycyna, tobramycyna, netylmycyna i amikacyna. Jak dotąd opracowane zostały antybiotyki nowej generacji do leczenia gronkowców, jednakże MRSA jest w stanie w bardzo szybkim tempie rozwijać mechanizmy oporności. Zatem znana jako lek ostatniej szansy wankomycyna czy nawet najnowsze leki jak linezolid i daptomycyna, nie są już skuteczne wobec izolatów MRSA.

Przedstawiająca się rzeczywistość stanowi podstawę do poszukiwania nowych metod leczenia lekoopornych infekcji przez zastosowanie terapii alternatywnych i poznania mechanizmów leżących u podstaw ujawniania się antybiotykooporności. Fakt ten stanowi motywację dla postawionych celów w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Celem rozpoczynającym badania jest kompleksowa charakterystyka zmian w aktywności transkrypcyjnej, translacyjnej oraz regulatorowej MRSA, będącej odpowiedzią na stres antybiotykowy. Zamiar ten zostanie osiągnięty poprzez określenie stężenia antybiotyku, przy którym zachodzą zauważalne procesy adaptacyjne, aby w następnej kolejności ocenić poziom aktywności komórkowej w danych warunkach posługując się techniką profilowania polisomów. Na tej podstawie obserwacje hodowli zostaną uzupełnione o informacje na jakim poziomie aktywności komórkowej znajdują się bakterie *Staphylococcus aureus* MRSA w warunkach wzrastającego stężenia wankomycyny. Ocena ta stanowi podstawę do podjęcia dalszych zadań badawczych, związanych z zastosowaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS) jako narzędzia do analizy sieci regulatorowej RNA oraz kontynuacji charakterystyki zmian w jej aktywności.

Kontynuację pierwszego oraz realizację następnego celu, polegającego na identyfikacji kluczowych komponentów regulatorowych RNA w odpowiedzi na stres antybiotykowy, umożliwi zastosowanie sekwencjonowania Term-seq. Sekwencjonowanie tego typu pozwala na precyzyjne ustalenie pozycji naturalnych końców 3' transkryptów, umożliwiając wnioskowanie na temat zdarzeń terminacji transkrypcji. Metoda ta reprezentuje odmienne podejście w tworzeniu bibliotek cDNA. Początkowym etapem przygotowania jest ligacja specyficznych adaptorów do końca 3' wszystkich transkryptów obecnych w mieszaninie przed przeprowadzeniem fragmentacji mRNA. Stanowi to podstawę w ustaleniu pozycji naturalnych końców 3', reprezentujących transkrypty pełnej długości, a także skróconych w wyniku aktywności ryboprzełączników lub innych mechanizmów opartych o zjawisko przedwczesnej terminacji transkrypcji, nie zaś powstałych w wyniku przeprowadzanej do utworzenia bibliotek fragmentacji. Uzyskany tym sposobem obraz transkryptomu przedstawia rzeczywistą ilość odczytów mapujących do regionu 5'UTR w stosunku do transkryptów pełnej długości, co umożliwia wskazanie potencjalnych regulatorów jakimi są ryboprzełączniki. Wskazanie zmian związanych z adaptacją do wankomycyny umożliwi analiza porównawcza obrazu transkryptomu pochodzącego z hodowli prowadzonej w warunkach kontrolnych oraz z wankomycyną. Kolejnym krokiem po identyfikacji jest weryfikacja biochemiczna uzupełniająca obserwacje o analizę ilościową aktywnych transkrypcyjnie ryboprzełączników. W tym celu wykorzystana zostanie opracowana w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej ICHB PAN metoda PTT-quant, pozwalająca na absolutne oznaczenie stężeń, w przeciwieństwie do technik stosowanych

standardowo, jak np. ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time quantitative PCR*, RT-qPCR). Metoda PTT-quant zakłada zaprojektowanie dla każdego kandydata na ryboprzełącznik trzech par starterów, z których pierwsza para komplementarna jest do sekwencji aptameru ryboprzełącznika znajdującego się w 5'UTR powyżej miejsca terminacji transkrypcji. Druga para starterów flankuje miejsce terminacji transkrypcji, trzecia zaś projektowana jest tak, aby amplifikowana była sekwencja otwartej ramki odczytu (ang. *open reading frame*, ORF) (Rysunek 35). Uzyskana w ten sposób różnica pomiędzy sygnałami od starterów 1 i 3 odzwierciedla stężenia skróconych transkryptów, będących rezultatem aktywności ryboprzełączników. Metoda ta dzięki wykorzystaniu RNazy H oraz odpowiedniemu projektowaniu starterów eliminuje wpływ odległości od końca 3' naturalnego transkryptu na ilość uzyskanego cDNA.

Zidentyfikowane ryboprzełączniki, których aktywność transkrypcyjna zostanie potwierdzona biochemicznie, będą stanowić obraz sieci regulatorowej charakterystycznej dla *Staphylococcus aureus* MRSA znajdującego się w trakcie stresu antybiotykowego. Wyniki eksperymentu będą stanowiły podstawę do oceny, które elementy regulatorowe w komórce stanowią potencjalne cele dla alternatywnych terapii antybiotykowych.

4 Materiały i metody

4.1 *Staphylococcus aureus* MRSA

Jako organizm modelowy do przeprowadzenia badań posłużył metycylinooporny szczep gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach. z oznaczeniem szczepu jako Mu50 [NRS1] oraz genotypem pvl negative. Pełna genomowa sekwencja została pobrana z GenBank o numerze dostępu NC_007795.

Wielkość genomu	%GC	Liczba genów kodujących	Liczba pseudogenów	tRNA	5s rRNA	16s rRNA	23 s rRNA
2 849 367 nt	32.85	2645	973	61	6	5	5

Tabela 2. Zestawienie cech genomu bakteryjnego *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach

4.2 Odczynniki

Enzymy

- Lizozym – 15 000 U/mg – Merck
- Lizostafyna – 0,4 U/μl – A&A Biotechnology
- DNaza – TURBO DNase [2 U/μl] – Thermo Fisher Scientific
- RNaza H – Ribonuclease H [5 U/μl] – Thermo Fisher Scientific
- DreamTaq PCR Master Mix (2x) – Thermo Fisher Scientific
- T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase) – New England BioLabs
- Nextera PCR master mix - Illumina

Antybiotyki

- Chlorowodorek wankomycyny – 100 mg/ml – Sigma Aldrich
- Chloramfenikol – Sigma Aldrich

Pozostałe odczynniki

- Obciążacz do DNA – TriTrack DNA Loading Dye (6x) – Thermo Fisher Scientific
- Agencourt AMPure XP - Beckman Coulter
- Barwnik fluorescencyjny – 1x SYBR Safe DNA Gel Stain – Thermo Fisher Scientific
- Woda wolna od RNaz – Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) – Thermo Fisher Scientific

- Koprecypitant – GlycoBlue Coprecipitant (15 mg/ml) – Thermo Fisher Scientific
- Alkohol etylowy 96% – Chempur
- Izopropanol – POCH
- Fenol, pH 4,5 – Bioshop
- Chloroform – Chempur
- Dimetylosulfotlenek (DMSO) – Sigma-Aldrich
- Agaroza – Bioshop
- Agar – Bioshop
- Ksylencjanol – Bioshop
- Bromofenol – Bioshop
- Kwaśny hydrolizat kazeiny – Bioshop
- Ekstrakt wołowy – Bioshop
- Skrobia – Bioshop
- Kwas borowy – Bioshop
- TRIS – Bioshop
- Mocznik – Bioshop
- EDTA, 0,5 M, pH 8,0 – Bioshop
- Glukoza – Bioshop

Zestawy

- Izolacja całkowitego RNA – Total RNA Purification Kit – NORGEN Biotek Corporation
- Analiza ilości i jakości RNA – Agilent RNA 6000 Nano Kit - Agilent Technologies
- Analiza ilości i jakości DNA – Agilent High Sensitivity DNA Kit – Agilent Technologies
- Odwrotna transkrypcja – SuperScript IV Reverse Transcriptase – Thermo Fisher Scientific
- Deplecja rRNA – MICROBExpress Bacterial mRNA Enrichment Kit – Invitrogen
- Ligacja 3'linkera - T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase) – New England BioLabs (NEB)
- Odwrotna transkrypcja przy tworzeniu bibliotek - SuperScript II Reverse Transcriptase – Thermo Fisher Scientific

Standardy do oznaczania wielkości kwasów nukleinowych

- RNA RiboRuler Low Range RNA Ladder, ready-to-use, Thermo Fisher Scientific
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use - Thermo Fisher Scientific

4.3 Startery i oligomery DNA

Zamieszczone w tabelach sekwencje starterów zaprojektowane zostały przy użyciu programu Primer-BLAST dostępnego na stronie NCBI. Oligomery DNA zaprojektowane zostały ręcznie. Dla wszystkich zaprojektowanych starterów ustalono zbliżoną temperaturę topnienia wynoszącą około 60°C

Tabela 3. Startery i oligomery do sekwencjonowania procedurą Term-seq.

Nazwa	Sekwencja (5' - 3')
3' Linker V-	NNCTCTCTACNNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGT
3' Linker V+	NNCAGAGAGGNNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGT
Starter RT	TCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC
3' Adapter	NNAGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC
Term-seq <i>fwd</i> V-	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGACTAGTCTTTCCCTACACGACGCTC
Term-seq <i>rev</i> V-	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTAGAGAGGTGACTGGAGTTCAGAC
Term-seq <i>fwd</i> V+	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTCTAGCTTCTTTCCCTACACGACGCTCT
Term-seq <i>rev</i> V+	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCTCTCTGGTGACTGGAGTTCAGAC

Tabela 4. Tabela. Startery do metody PTT-quant.

GEN	Nazwa startera	Sekwencja startera (5' - 3')
Komponent I kwasu antranilowego	ASC F1	GGTAGCAACAGAAAGTTAGTGGG
	ASC R1	GCGCCAGCATCCTTATCA
	ASC F2	TATTGATAAGGATGCTGGCGCT
ASC	ASC R2	ATAACAACCTGAATAGCGACCTTTAG
	ASC F3	TATCCACATAAACGGGGCGT
	ASC R3	AACGCCACAACCAGCTTCTA
Dwufunkcyjna autolizyna	BA F1	TGTGGATICTAGGTTTGATAGGG
	BA R1	CCGAAGCACTGACTCTTAACCTG
	BA F2	TAAGAGTCAGTGCTTCGGCA
BA	BA R2	AATCCCAGCATTGTGCTCCC
	BA F3	CCAGCAAAAGCAATCATGGGC
	BA R3	TGTACTTGCTTGATGTTGGCAC
	MST F1	TGTCACACTAGAAAATAGTTGTGC

Cukrowy transporter ABC, białko wiążące ATP	MST R1	GCCATGTTATGCCTCCCATAC
	MST F2	GAGGCATAACATGGCAGAAGT
	MST R2	TCATGCGTTCCCCATCAAT
	MST F3	TCAAACCTTCTCCAGAGACACAA
	MST R3	ATCTTGTCGTTCCGCCATCACT
	Transferaza dimetyloadenozynowa	DT F1
DT	DT R1	CTCGCGTTCTTGATGGTGTT
	DT F2	TGCAACACCATCAAGAACGC
	DT R2	GCATGTCTGGCCAATTGTTCT
	DT F3	AGCAGCATTTCACAAAGAAGA
	DT R3	AGATAGCGTTTCACCGCGAC
	Kinaza homoseryny	HSK F1
HSK	HSK R1	ACTCCAAGGTTGGCTGTTGA
	HSK F2	TCCTGCATCAACAGCCAACC
	HSK R2	AGCAACTTGTTGTGCTACATGA
	HSK F3	CATGAACCGTATCGTCAGCA
	HSK R3	AGAGCGAACCAATTCCCCAC
	Podjednostka D kompleksu antyporterowego	MCAS F1
MCAS	MCAS R1	CCTAGTGCACATAACGCTT
	MCAS F2	AAAGCGTTATGTCGCACTAGG
	MCAS R2	TTAGTAGGGCACTGAATATGTCTAA
	MCAS F3	TTCGCATATTCTACAAGGCT
	MCAS R3	TTTCTGCACCAGCTTTTACCA
	Transporter ABC, białko wiążące ATP	PABCT F1
PABCT	PABCT R1	CCGCTTGAAGTGTAGTTTCATCAT
	PABCT F2	TGATGAAACTACAGTTCAAGCGG
	PABCT R2	TTTGTTGTAACGCTGAAGTTGA
	PABCT F3	GGCAGTGTCCGCTTTAGAC
	PABCT R3	CAGTTCAACGATTTCCGCCAT

Tabela 5. Oligomery DNA do reakcji cięcia RNazą H.

GEN	Nazwa	Sekwencja (5'- 3')
Transporter ABC, Białko wiążące ATP	Oligo PABCT	TAGGATATGTTTTTTTCGTAAT
Podjednostka D kompleksu antyporterowego	Oligo MCAS	GATAATTGCCGCGACCAAGGTT
Kinaza homoseryny	Oligo HSK	AATTTATCTAAAGCCATACCTA
Komponent I syntazy kwasu antranilowego	Oligo ASC	ATCCATTCTATACGCTCCTTTC
Dwufunkcyjna autolizyna	Oligo BA	TGTATGCACCTCATTTCATCA
Transferaza dimetyloadenozyny	Oligo DT	ATCTATCAAAAAGTTCTGTCTT

Cukrowy transporter ABC, białko wiążące ATP	Oligo MST	CTTTGTCAGTAATATGTAGATT
---	-----------	------------------------

4.5 Protokoły

4.5.1 Warunki hodowli *Staphylococcus aureus*

W eksperymencie wykorzystane zostały dwa warunki hodowli, kontrolna oraz z czynnikiem stresowym, którym był dodatek antybiotyku. Hodowle prowadzone były w warunkach optymalnych dla wzrostu *S. aureus*, 37°C z wytrząsaniem, aż do uzyskania OD₆₀₀ mieszczącego się w przedziale od 0,7 do 1,0. Objętość hodowli bakteryjnej zależała od jej dalszego przeznaczenia. W celu przeprowadzenia profilowania rybosomowego objętość pojedynczej hodowli w każdym warunku wynosiła 200 ml natomiast w pozostałych eksperymentach - 20 ml.

Skład pożywki do hodowli *S. aureus*: Bulion Muellera-Hinton (MHA) (1 l): kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g), ekstrakt wołowy (2 g), skrobia (1,5 g)

4.5.2 Izolacja całkowitego RNA

Dla każdej metody hodowlę prowadzono jak w punkcie 4.5.1. W celu uzyskania osadu bakteryjnego hodowlę wirowano z prędkością 2 300 rcf przez 5 minut w temperaturze otoczenia.

Metoda 1

Do uzyskanego z 2 ml hodowli osadu bakteryjnego dodano 1 ml Trizolu i wytrząsano przez 1 minutę. Następnie dodano chloroform o objętości 200 µl, wytrząsano 3 minuty. Po zwirowaniu w 12 000 rcf przez 15 minut w 4°C zebrano górną fazę do nowych probówek i prowadzono precypitację przez noc w -20°C z dodatkiem 70% etanolu stanowiącego 2,5 objętości górnej frakcji, 3M octanu sodu stanowiącego 0,1 objętości mieszaniny oraz 1 µl koprecypitantu GlicoBlue. RNA wirowano w 12 000 rcf w 4°C przez 30 minut. Osad podsuszano przez 15 minut w temperaturze otoczenia i zawieszono w 20 µl wody wolnej od RNaz.

Metoda 2

Do 2 ml hodowli dodano 2 ml mieszaniny fenol : etanol w stosunku 5 : 95 oraz kulki szklane o średnicy <100 µm i wytrząsano przez 1 minutę. Mieszaninę inkubowano przez 1 godzinę na lodzie. Następnie wirowano w 3 600 rcf w 4°C przez 10 minut i pobrano frakcję z nad kulek. Po dodaniu 2 objętości chloroformu i wytrząsaniu przez 1 minutę

wirowano przez 1 minutę w 3 600 rcf po czym przeprowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 3

Do 2 ml hodowli dodano 2 ml mieszaniny aceton : etanol w stosunku 50 : 50 i inkubowano w -80°C przez 16 godzin. Po rozmrożeniu na lodzie do mieszaniny dodano 1 ml Trizolu oraz kulki szklane stanowiące 1/10 objętości mieszaniny, wytrząsano 1 minutę. Następnie wirowano w 3 600 rcf w 4°C przez 10 minut i pobrano frakcję z nad kulek. Dodano chloroform stanowiący 2 objętości frakcji i wytrząsano przez 1 minutę, następnie wirowano przez 1 minutę w 3 600 rcf, po czym przeprowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 4

Pobrane 2 ml hodowli inkubowano w 95°C przez czas 10 minut. Następnie dodano 2 ml Trizolu i wytrząsano przez 1 minutę. Następnie dodano 2 ml chloroformu i wytrząsano przez 1 minutę. Po zwirowaniu w 12 000 rcf przez 15 minut w 4°C zebrano górną frakcję do nowych próbek i prowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 5

Hodowlę o objętości 2 ml połączono z 2 ml Trizolu, wytrząsano w temperaturze 95°C przez 10 minut. Następnie dodano 2 ml chloroformu i wytrząsano przez 1 minutę. Po zwirowaniu w 12 000 rcf przez 15 minut w 4°C zebrano górną frakcję do nowych próbek i prowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 6

Hodowlę o objętości 2 ml połączono z 2 ml fenolu, wytrząsano w temperaturze 95°C przez 10 minut. Następnie dodano 2 ml chloroformu i wytrząsano przez 1 minutę. Po zwirowaniu w 12 000 rcf przez 15 minut w 4°C zebrano górną frakcję do nowych próbek i prowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 7

Hodowlę o objętości 2 ml połączono z 2 ml fenolu oraz dodatkiem kulek szklanych wynoszących 1/10 objętości mieszaniny. Następnie inkubowano przez 10 minut w 95°C z jednoczesnym wytrząsaniem. Następnie wirowano w 3 600 rcf przez 10 minut i pobrano frakcję z nad kulek. Dodano chloroformu stanowiący 2 objętości frakcji i wytrząsano przez minutę, następnie wirowano w 3 600 rcf po czym przeprowadzono precypitację jak w Metodzie 1.

Metoda 8

Uzyskany z 2 ml hodowli osad bakteryjny zawieszono w 350 μ l mieszaniny lizozymu [5 mg/ml] oraz lizostafiny [3U] i inkubowano temperaturze 37°C przez 30 minut. Ciąg dalszy izolacji przeprowadzono przy użyciu zestawu Total RNA Purification Kit firmy NORGEN Biotek Corporation bazującego za zasadzie oczyszczania RNA przy pomocy kolumnienek. RNA zawieszono w 50 μ l buforu do elucji dołączonym przez producenta.

Metoda 9

Uzyskany z 2 ml hodowli osad bakteryjny zawieszono w 350 μ l mieszaniny lizozymu [5 mg/ml] oraz lizostafiny [5U] i inkubowano temperaturze 37°C przez 30 minut. Ciąg izolacji przeprowadzono przy użyciu Total RNA Purification Kit firmy NORGEN Biotek Corporation jak w Metodzie 8.

Metoda 10

Uzyskany z 2 ml hodowli osad bakteryjny zawieszono w 350 μ l mieszaniny lizozymu [5 mg/ml] oraz lizostafiny [3U] i inkubowano temperaturze 37°C przez 30 minut. Następnie dodano 1,65 ml wody wolnej od RNaz, wytrząsano 30 sekund i dodano 1 ml Trizolu. Ciąg dalszy procedury kontynuowano jak w Metodzie 1 od dodania chloroformu.

4.5.3 Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Elektroforetyczny rozdział kwasów nukleinowych w żelu agarozowym stosowany był do analizy całkowitego RNA oraz cDNA otrzymanego metodą PCR. Stężenie agarozy dobierane było w zależności od długości analizowanych fragmentów od 0,5% dla RNA do 2% dla cDNA. Do fluorescencyjnego wybarwienia kwasów nukleinowych zastosowano 1x SYBR Safe DNA Gel Stain. Próby obciążane były przy pomocy obciążacza denaturującego dla RNA oraz obciążacza do DNA w stosunku 5:1. Elektroforeza prowadzona była pod stałym napięciem 80 – 120V, w zależności od wielkości żelu. W celu wizualizacji kwasów nukleinowych stosowano przenośny transiluminator BLook LED firmy GeneDireX oraz systemy do dokumentacji żeli Azure Biosystems.

Skład buforu elektroforetycznego 1x TBE: 100 mM Tris, 100 mM kwas borowy, 1 mM EDTA, pH 8,3

4.5.4 Analiza jakościowa i ilościowa kwasów nukleinowych

Pomiar z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop One

Stężenie oraz czystość kwasów nukleinowych oznaczano poprzez wykonanie pomiaru z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop One Microvolume UV-Vis

Spectrophotometer. Jeden z dwóch parametrów czystości określono na podstawie stosunku absorbancji mierzonej przy długości fali 280 nm oraz 230 nm (A260/280) oraz na podstawie stosunku absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm oraz 230 nm (A260/230). Wartości wskazujące na wysoką jakość i czystość wynosiły około 2,0 – 2,2.

Pomiar z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer

Metodę tę wykorzystano do oceny jakości oraz ilości kwasów nukleinowych w trakcie przygotowywania biblioteki do sekwencjonowania Term-seq (Rozdział 4.5.9). Wykorzystane zestawy to Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent High Sensitivity DNA Kit. Procedury przeprowadzono zgodnie z protokołami zamieszczonymi przez producenta.

4.5.5 Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego dla *Staphylococcus aureus* MRSA w hodowli z wankomycyną.

Podłoże stałe

W celu wyznaczenia minimalnego stężenia inhibującego na podłożu stałym prowadzono hodowlę jak w punkcie 4.5.1. Posiew redukcyjny wykonano za pomocą ezy na podłoża stałe z dodatkiem wankomycyny o następujących stężeniach: 0,0 mg/l, 0,06 mg/l, 0,125 mg/l, 0,25 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16mg/l, 18 mg/l, 20 mg/l, 22 mg/l, 24 mg/l, 26 mg/l, 28 mg/l, 30 mg/l, 32 mg/l. Płytki inkubowano w 37°C. Odczyt wykonano po całonocnej inkubacji.

Skład podłoża stałego do wyznania MIC (1 l): Bulion Muellera-Hintona (MHA) (1 l): kwaśny hydrolyzate kazeiny (17,5 g), ekstrakt wołowy (2 g), skrobia (1,5 g), agar (10 g), wankomycyna

Hodowla płynna

Określenie minimalnego stężenia inhibującego dla hodowli płynnej rozpoczęto od prowadzenia hodowli bakteryjnej jak w punkcie 4.5.1. Następnie wykonano posiew redukcyjny na podłoże stałe i całonocną inkubację w 37°C. Po tym czasie przeniesiono pojedynczą kolonię do pożywki płynnej (MHA) o objętości 20 ml zawierającej odpowiednie stężenie wankomycyny. Prowadzono hodowle bakteryjne z antybiotykiem o następujących stężeniach: 0,06 mg/l, 0,125 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 0,75 mg/l, 1 mg/l, 1,25 mg/l, 1,5 mg/l, 1,75 mg/l, 2 mg/l, 2,25 mg/l, 2,5 mg/l, 2,75 mg/l, 3 mg/l. Odczyt

wykonano po całonocnej inkubacji w wytrząsaniu. Hodowlę prowadzono bez dostępu światła dziennego.

Skład pożywki do wyznaczenia MIC w hodowli płynnej *S. aureus*: Bulion Muellera-Hintona (MHA) (1 l): kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g), ekstrakt wołowy (2 g), skrobia (1,5 g), wankomycyna

4.5.6 Wyznaczenie krzywej wzrostu *Staphylococcus aureus* MRSA.

Wyznaczanie krzywej wzrostu rozpoczęto od prowadzenia hodowli bakteryjnej jak w punkcie 4.5.1. Następnie wykonano posiew redukcyjny na podłoże stałe i całonocną inkubację w 37°C. Po tym czasie przeniesiono pojedynczą kolonię do pożywki płynnej (MHA) o objętości 20 ml zawierającej odpowiednie stężenie wankomycyny. Prowadzono hodowle bakteryjne z dodatkiem antybiotyku o następujących stężeniach: 0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l. Od momentu przeniesienia pojedynczej kolonii wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali 600nm w odstępach czasowych (30 minut). Pomiar dla każdej z hodowli prowadzono, aż do momentu osiągnięcia OD powyżej 1,6 oznaczającej wchodzenie w fazę równowagi.

Skład podłoża stałego do posiewu redukcyjnego (1 l): Bulion Muellera-Hintona (MHA) (1 l): kwaśny hydrolizat kazeiny (17,5 g), ekstrakt wołowy (2 g), skrobia (1,5 g), agar (10 g)

4.5.7 Analiza aktywności metabolicznej *S. aureus*.

Do określenia aktywności metabolicznej *S. aureus* MRSA w ekspozycji na zróżnicowane stężenie antybiotyku wankomycyny (0-2 mg/l) zastosowano test MTT. Hodowlę *Staphylococcus aureus* MRSA prowadzono jak w punkcie 4.5.1. Przed przystąpieniem do eksperymentu podgrzano po cztery 1,5-ml probówki dla każdej z badanych prób, pożywkę MHA oraz roztwór MTT. Zawiesiny komórek *S. aureus* przygotowano przez rozcieńczenie do wartości OD₆₀₀ 0,01 – 0,18 w świeżej pożywce MHA. Dla każdego z warunków zastosowano 4 powtórzenia. Aby zainicjować reakcję redukcji, roztwór MTT (5 g/L) dodano do świeżo rozcieńczonych komórek (1/10, obj./obj.) i inkubowano przez 20 minut w temperaturze 37°C. Wytworzone kryształki formazanu zebrano przez odwirowanie (10 000 x g, 20 – 30 s), a pożywkę odpipetowano. Aby rozpuścić osad, dodano DMSO i wytrząsano. Zawiesinę przeniesiono do czystych kuwet spektrofotometrycznych. Do każdej kuwety dodano DMSO do uzyskania

końcowej objętości 2500 μ l. OD mierzono w spektrofotometrze przy długości fali równej 550 nm, stosując DMSO jako próbę ślepą. Jedną jednostkę redukcji MTT (MRU, ang. *MTT reduction unit*) definiuje się jako wartość A550 równą 1,0 wytwarzaną przez rozpuszczone kryształy formazanu z komórek w pożywce MHA w temperaturze 37°C w ciągu 20 minut zgodnie z równaniem :

$$\text{MRU} = A_{550} * (2500 \mu\text{l} / 220 \mu\text{l}) * (1000 \mu\text{l} / 200 \mu\text{l}) * K / \text{OD}_{600}$$

Równanie 1. Współczynnik redukcji MTT (MRU, ang. *MTT reduction unit*). K - stopień rozcieńczenia *S. aureus* pożywką MHA, 200 μ l objętość rozcieńczonej hodowli *S. aureus*, 220 μ l całkowita objętość mieszaniny [185].

Aktywność redukującą MTT dla komórek *S. aureus* uśredniono z czterech oznaczeń z odpowiednimi odchyleniami standardowymi i przedstawiono jako MRU na OD600 i na mililitr hodowli bakteryjnej.

4.5.8 Frakcjonowanie rybosomów w gradiencie sacharozy

Procedura ta obejmuje trzy główne etapy. Pierwszy z nich to zatrzymanie translacji. Hodowlę *Staphylococcus aureus* MRSA o objętości 200 ml prowadzono w 1 litrowych kolbach, aż do uzyskania logarytmicznej fazy wzrostu o $\text{OD}_{600} = 0,4$. W tym punkcie dodano chloramfenikol do uzyskania stężenia końcowego 100 μ g/ml oraz równą objętość chloramfenikolu w formie lodu, również o stężeniu 100 μ g/ml. Hodowlę szybko schłodzono do temperatury bliskiej 0°C. Następnie zwirowany (4 000 rcf, 2 minuty) osad bakteryjny zawieszono w buforze A. Po ponownym wirowaniu określona została dokładna waga osadu, którą rozpuszczono w dwóch objętościach buforu B. Preparat taki nadaje się do przechowywania w temperaturze -80°C. Kolejny etap obejmujący homogenizację oraz oczyszczanie lizatu bakteryjnego rozpoczęto od przeniesienia osadu zawieszonego w buforze A w próbówce o objętości 50 ml do ciekłego azotu. Tak zmrożony osad umieszczono w zbiorniku do homogenizacji (ang. *grinding jar*). Rozdrabnianie prowadzono w urządzeniu TissueLyser II przez 3 minuty w 8 cyklach z częstotliwością 15 Hz. Każdorazowo po zakończonym cyklu zbiorniki umieszczane były w ciekłym azocie. Istotne, aby na tym etapie został zachowany poziom chłodzenia. Sproszkowany osad zawieszono w buforze C w 2ml próbówce typu Eppendorf, a następnie w celu oddzielenia białek wirowano w 20 000 x g, w 4°C przez 10 minut. Uzyskaną fazę wodną przeniesiono do nowej próbówki umieszczonej w statywie

chłodzącym i określono wartość absorbancji przy fali o długości 260 nm. Następnie odmierzoną objętość odpowiadającą 5 jednostkom A_{260} podano na liniowy liniowy gradient sacharozowy 10-45% utworzony przy pomocy urządzenia Gradient Master. Program do uzyskania gradientu charakteryzował się następującymi parametrami : 4:06 min, kąt nachylenia 80°, szybkość 8 km/h, całość uzyskana w 1 kroku. Wszystkie próby zostały poddane wirowaniu (3h, 260 000 rcf , 4 °C). Rozdzielone próby umieszczono w stacji mocowania probówki urządzenia Piston Gradient Fractionator firmy Biocomp. Kolekcjonowanie frakcji przebiegło zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta. Objętość zbieranych frakcji wynosiła 700 μ l. Makrokompleksy rybonukleoproteinowe takie jak polisomy, wykazują dużą wrażliwość rybonukleazy oraz temperaturę, dlatego sprzęt i materiały użyte w eksperymencie zostały pozbawione RNaz. Podczas przygotowywania buforów używano ultraczystej wody, gotowe bufony i sacharozę oczyszczono za pomocą filtrów strzykawkowych o średnicy 0,22 μ m i zachowano ochronne warunki niskiej temperatury.

Skład buforów do frakcjonowania polisomowego w gradiencie sacharozy

Bufor A – 20 mM HEPES pH 7,5, 14 mM MgOAc, 100 mM KOAc, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF 0,5

Bufor B – 1,1 M sacharoza, 20 mM HEPES pH 7,5, 14 mM MgOAc, 500 mM NH₄Cl, 0,5 mM EDTA pH 8

Bufor C – 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgOAc 10, 100 mM NH₄Cl, 5 mM CaCl₂

4.5.9 Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania Term – seq

Izolacja RNA

Dla każdego z warunków, tj. kontroli oraz hodowli *S. aureus* MRSA w obecności wankomycyny o stężeniu 2 mg/l przeprowadzona została izolacja RNA zgodnie opisem zawartym w punkcie 4.5.2. Metodą 8.

Usuwanie pozostałości DNA

Po przeprowadzeniu analizy jakościowej oraz ilościowej wyizolowanego RNA, próby poddano oczyszczaniu z pozostałości DNA. Do przeprowadzenia reakcji użyto 100 μ g RNA dla każdego z warunków (hodowla kontrolna oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l). Do RNA zawieszono w 88 μ l wody wolnej od RNaz dodano 10 μ l buforu do

DNazowania (Thermo Fisher Scientific) oraz 0,04 U/ μ l enzymu Turbo DNase. Reakcję inkubowano w 37°C przez 30 minut.

Eliminacja rRNA

10 μ g całkowitego RNA poddano usuwaniu rRNA przy użyciu zestawu MICROBExpress. W zestawie zastosowano zmodyfikowaną metodę hybrydyzacji wychwyty, aby usunąć występujące w dużych ilościach rRNA z mieszaniny całkowitego RNA. Procedura deplecji przeprowadzona została zgodnie z protokołem producenta, który obejmuje cztery główne etapy. W pierwszym z nich przeprowadzono hybrydyzację RNA z mieszaną oligonukleotydów wychwytyjących rRNA, prowadzono inkubację w 70 °C przez 10 minut oraz 37 °C przez 15 minut. Drugi etap zakładał odpowiednie przygotowanie (oczyszczono oraz zawieszono w buforze wiążącym) kulek magnetycznych powleczonych oligonukleotydem, które hybrydują z oligonuklotydem wychwytyjącym rRNA. W trzecim etapie do oczyszczonych kulek magnetycznych dodano hybrydyzowane RNA z etapu pierwszego. Inkubowano w 37 °C przez 15 minut. Eliminacja rRNA została przeprowadzona przy użyciu statywu magnetycznego, który unieruchamiając kulki magnetyczne z wyłapanym rRNA umożliwił pobranie eluatu wzbogaconego o mRNA. W ostatnim etapie przeprowadzono precypitację do której użyto 3 M octanu sodu stanowiącego 1/10 objętości mieszaniny uzyskanego mRNA, glikogen o stężeniu 5 mg/l w objętości stanowiącej 1/50 objętości mieszaniny oraz 3 objętości 100% etanolu. Precypitację prowadzono przez noc w -20 °C. Następnie wirowano przez 30 minut w 10 000 x g, osad RNA podsuszono w temperaturze otoczenia oraz zawieszono w 25 μ l wody wolnej od RNaz.

Ligacja 3' Linkera do RNA

Kolejny etap przygotowania bibliotek wymagał ligacji 3' Linkera do 3' końców cząsteczek RNA. 3' Linkery zostały zaprojektowane tak, aby ich sekwencja nukleotydowa była komplementarna do zaprojektowanego startera odwrotnej transkrypcji oraz aby zawierały sekwencję komplementarną do sekwencji rozróżniającej (indeksu) podczas sekwencjonowania. Stąd, zaprojektowano dwa 3' Linkery: dla biblioteki powstałej z RNA izolowanego z *S. aureus* hodowanego w obecności (V+) i bez (V-) wankomycyny (Tabela 3). Cząsteczki RNA (1 μ g) oraz 3' Linker stanowiły substrat reakcji ligacji przeprowadzonej przez T4 ligazę RNA 1. Do przeprowadzenia pojedynczej reakcji użyto: 1 μ l 3' Linkera [150 μ M], 2,5 μ l 10x Buforu T4 ligazy 1, 2,5 μ l ATP [10

mM], 2 μ l DMSO, 9,5 μ l PEG8000 [50%], 2,5 jednostek T4 ligazy 1 (NEB). Końcowa objętość każdej reakcji wynosiła 25 μ l. Inkubację prowadzono przez 2,5 godziny w temperaturze 23°C. Po zakończonej ligacji przeprowadzono oczyszczanie produktów reakcji przy użyciu kulek paramagnetycznych firmy Agencourt AMPure XP, dodanych w objętości 2,2x (55 μ l) na każdą reakcję. Supernatant został oddzielony od kulek przy użyciu 96-dółkowego separatora magnetycznego (Invitrogen). Supernatant usunięto, a zabezpieczone przez unieruchomione kulki paramagnetyczne RNA dwukrotnie przemyto świeżo przygotowanym 70% etanolem, RNA wyeluowano 10 μ l wody wolnej od RNaz.

Fragmentacja RNA

Fragmentację przeprowadzono na 9 μ l RNA po ligacji 3' Linkera. Do reakcji dodano 1 μ l buforu do fragmentacji (Ambion) i rozpoczęto inkubację w temperaturze 72°C przez 1,5 minuty. Zatrzymanie reakcji przeprowadzono przez dodanie 1 μ l roztworu Stop, po czym natychmiast przeprowadzono oczyszczanie przy użyciu kulek paramagnetycznych firmy Agencourt AMPure XP dodanych w objętości 2,2x (24,2 μ l), zgodnie z opisem zamieszczonym przy Ligacji 3' linkera. Elucję RNA przeprowadzono wodą w objętości 13 μ l.

Odwrotna transkrypcja

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji użyto 11 μ l RNA po fragmentacji oraz starter RT (Tabela 3). Mieszanina reakcyjna zawierała: 11 μ l RNA, 1 μ l startera RT [10 mM], 1 μ l mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) [10 mM], 200 jednostek odwrotnej transkryptazy SuperScript II (Thermo Fisher Scientific), 2 μ l DTT [100 mM] oraz bufor do reakcji. Inkubację prowadzono w 25 °C przez 10 min, następnie w 42°C przez 50 minut oraz 75°C przez 15 minut. W celu usunięcia pozostałości matrycy RNA dodano 500 jednostek rybonukleazy H (NEB). Inkubację prowadzono w 37°C przez 30 minut. Po jej zakończeniu przystąpiono do oczyszczania reakcji przy użyciu kulek paramagnetycznych firmy Agencourt AMPure XP dodanych w objętości 2,2x (46 μ l), zgodnie z opisem zamieszczonym przy Ligacji 3' Linkera. Elucję cDNA przeprowadzono wodą w objętości 6 μ l.

Ligacja Adaptera do cDNA

Ligacja Adaptera do końców 3' cDNA została przeprowadzona dla 5 µl cDNA po odwrotnej transkrypcji. W tym celu do reakcji wykorzystano 1 µl Adaptera [150 µM], 2,5 µl 10x buforu T4 ligazy 1, 2,5 µl ATP [10 mM], 2 µl DMSO, 9,5 µl PEG8000 [50%] oraz 2,5 jednostek T4 ligazy 1 (NEB). Końcowa objętość reakcji wynosiła 25 µl. Inkubację prowadzono 23°C przez 8 godzin, a następnie próbki z reakcją umieszczono na 2 minuty na lodzie. Po tym czasie reakcje poddano oczyszczaniu przy użyciu kulek paramagnetycznych firmy Agencourt AMPure XP dodanych w objętości 1,8x (45 µl) zgodnie z opisem zamieszczonym przy Ligacji 3' linkera. Elucję cDNA przeprowadzono wodą w objętości 23 µl.

Amplifikacja bibliotek Term-seq

Ostatnim etapem przygotowania bibliotek była amplifikacja, podczas której następowało przyłączenie adapterów różnicujących biblioteki (indeksów) do sekwencjonowania, co umożliwiło zsekwencjonowanie wszystkich bibliotek w jednej rundzie (ang. *pooled sequencing*). W tym celu użyto cDNA z poprzedniego etapu w objętości 22 µl, 15 µl mieszaniny Nextera PCR master mix oraz po 5 µl starterów: *forward* (Term-seq *fwd* V- dla hodowli kontrolnej oraz Term-seq *fwd* V+ dla hodowli z wankomycyną 2 mg/l). Reakcję amplifikacji prowadzono w 72°C przez 3 minuty następnie 95°C przez 30 sekund oraz w 14 cyklach: 95°C przez 10 sekund, 55°C przez 30 sekund oraz 72°C przez 30 sekund, termicznym etapem zakańczającym była inkubacja w 72 °C przez 5 minut. Po zakończonej reakcji amplifikacji próby poddano oczyszczaniu przy użyciu kulek paramagnetycznych firmy Agencourt AMPure XP dodanych w objętości 0,8x (45 µl). Biblioteki Term-seq eluowano w 17 µl wody poddano analizom ilościowym oraz jakościowym przy pomocy elektroforezy kapilarnej Agilent 2100 Bioanalyzer. Stężenie sporządzonych bibliotek zostało obliczone zgodnie z następującym wzorem: $(1\ 500 / \text{średnia długość amplitonów wyrażona w bp}) \times (\text{stężenie wagowe}) = \text{stężenie molowe [nM]}$

Tak przygotowane biblioteki przekazane zostały do sekwencjonowania.

4.5.10 Metoda PTT-quant

Endonukleolityczne cięcie RNazą H

Pulę całkowitego RNA poddano oczyszczaniu z pozostałości DNA, a następnie dla każdego kandydata (Ryboprzełącznik PABCT, Ryboprzełącznik MST, Ryboprzełącznik MCAS, Ryboprzełącznik HSK, Ryboprzełącznik ASC, Ryboprzełącznik BA, Ryboprzełącznik DT) i warunku hodowli (hodowla z wankomycyną oraz kontrola) odmierzono 100 ng RNA. RNA inkubowano ze specyficznym dla danego kandydata oligomerem DNA (Tabela 5) przez 20 minut w 37°C, a następnie przeprowadzono cięcie dupleksów DNA- RNA przy pomocy RNazy H (1,25 jednostek, Thermo Fisher Scientific), zgodnie z protokołem producenta.

Odwrotna transkrypcja (RT)

Odwrotna transkrypcja została przeprowadzona przy pomocy zestawu SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z protokołem producenta. Do syntezy cDNA zastosowano 100 ng całkowitego RNA, poddanego endonukleolitycznemu cięciu przy udziale RNazy H oraz startery w postaci heksamerów o losowej sekwencji. Reakcję prowadzono w temperaturze 23°C przez 10 minut, następnie w 55°C przez 10 minut oraz w 80°C przez 10 minut.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu mieszaniny DreamTaq PCR Master Mix (2x). Mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl składała się z 1 µl cDNA, 1 µl mieszaniny starterów *forward* i *reverse* do metody PTT-quant (Tabela 4) o stężeniu 4 µM każdy, 12,5 µl DreamTaq PCR Master Mix (2x) oraz 10,5 µl H₂O. Reakcję amplifikacji prowadzono zgodnie z następującym zapisem : 95°C – 3 min, (95°C – 30 sek, 60°C – 30 sek, 72°C – 1 min) x35, 72°C – 5 min, 10°C – ∞.

Emulsyjny PCR (ddPCR)

Łańcuchową reakcję polimerazy wykonano przy pomocy emulsyjnego PCR w czasie rzeczywistym używając systemu QX200 Droplet Digital PCR. Do przygotowania reakcji posłużono się zestawem akcesoriów i odczynników firmy Bio-Rad Laboratories. Mieszanina reakcyjna została wykonana zgodnie z następującą proporcją: 8 µl H₂O, 10 µl 2x QX200 ddPCR EvaGreen Supermix, 1 µl mieszaniny starterów *forward* i *reverse* o stężeniu 4 µM każdy oraz 1 µl cDNA. Tak przygotowaną mieszaninę

reakcyjną przeniesiono do kartridża z olejem do generowania kropeł i po zabezpieczeniu uszczelką przeniesiono do generatora kropeł. Zhomogenizowaną próbkę umieszczono w płytce 96-dółkowej kompatybilnej z termocyklerem T100 Thermal Cycler firmy Bio-Rad oraz zabezpieczono przez termiczne zgrzewanie płytki folią aluminiową. Reakcję prowadzono zgodnie z następującym zapisem: 95°C – 5 min, (95°C – 30 sek, 55°C – 30 sek, 72°C – 45 sek) x40, 72°C – 2 min, 4°C – 5 min, 90°C – 5 min, 10°C – ∞. Istotnym elementem programowania cykli jest ustawienie skoku temperaturowego co 2°C. Pomiar stężenia transkryptów przeprowadzono przy użyciu czytnika kropeł firmy Bio-Rad Laboratories.

4.6 Aparatura

- Cieplarka do hodowli bakterii – Mini Incubator – Labnet
- Wytrząsarka do hodowli bakterii – Excella E24 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific
- Wirówka – Centrifuge 5424 R – Eppendorf
- Termomikser – Thermo Mixer-Heat/Cool – Novazym Polska
- Qubit 4 Fluorometer
- Tissue Lyser II – QIAGEN
- Piston Gradient Fractionator - Biocomp
- Gradient Master – Biocomp
- Specord 50 PLUS – Analytik Jena
- Wytrząsarka o ruchu drgającym – MS 3 Vortexer for Agilent 2100 Bioanalyzer-IKA
- Analizator kapilarny Bioanalyzer 2100 – Agilent
- Transiluminator BLOOK LED – GeneDireX
- Termocykler – Tprofesional Basic Gradient – Biometra
- Zestaw do elektroforezy poziomej – Wide Mini-Sub Cell GT Cell – Bio-Rad
- Zasilacz – PowerPac HC 300W – Bio-Rrad
- Spektrofotometr UV/VIS – NanoDrop One – Thermo Fisher Scientific
- Zgrzewarka do płytek 96-dółkowych – PX1 PCR Plate Seale – Bio-Rad
- Generator kropeł – QX200 Droplet Generator – Bio-Rad
- Termocykler – T100 Thermal Cycler – Bio-Rad
- Czytnik kropeł – QX200 Droplet Reader – Bio-Rad

5 Wyniki i Dyskusja

5.1 Charakterystyka MRSA

Wnikliwy wgląd w mechanizmy regulatorowe RNA na poziomie transkrypcji umożliwia zastosowanie technologii NGS (ang. *next generation sequencing*). Jednakże uzyskanie wiarygodnych wyników tą techniką wymaga dużej uważności na każdym etapie przygotowywania bibliotek cDNA. Jednym z kluczowych elementów w sekwencjonowaniu transkryptomu jest analiza ilościowa docelowej puli cząsteczek RNA, dlatego tak istotnym aspektem jest eliminacja czynników wpływających na odchylenia. Spełnienie tego standardu wymagało, aby każdy etap poprzedzający powstanie bibliotek był bardzo dobrze zoptymalizowany, poczynając od doboru metody izolacji RNA, następnie przez ustalenie warunków hodowli z MIC dla wankomycyny, oraz określenie aktywności translacyjnej w stresie antybiotykowym. Jedną z głównych motywacji tej części badawczej było określenie stężenia antybiotyku, przy którym zachodzą zauważalne procesy adaptacyjne u antybiotkoopornej bakterii *Staphylococcus aureus* MRSA o obniżonej wrażliwości na wankomycynę.

5.1.1 Dobór i optymalizacja metody izolacji RNA

Podstawą efektywnej analizy kwasów rybonukleinowych jest dobór metody izolacji o jak najlepszych wyróżnikach jakościowych oraz ilościowych. W przypadku lekoopornego szczepu gronkowca złocistego jest to szczególnie wymagające wyzwanie ze względu na specyfikę morfologiczną budowy. W celu optymalizacji procedury zostało przetestowanych kilkanaście wariantów metod spośród dostępnych w literaturze naukowej. W poszukiwaniu najbardziej optymalnej i powtarzalnej metody zastosowano kombinacje wielu technik i podejść. Do każdej spośród poniższych metod użyto bakterie będące w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu pochodzące z hodowli płynnej.

Jako pierwsza przetestowana została metoda opierająca się na działaniu Trizolu (ang. *Total RNA Isolation*) powszechnie określanego jako złoty standard w oczyszczaniu RNA. Jest to mieszanina fenolu, izotiocyanianu guanidyny oraz soli chaotropowych prowadzących do lizy komórek oraz inaktywacji natywnych RNaz. Ważne, aby do izolacji RNA zastosować Trizol o niskim pH celem usunięcia DNA. Stosując ten odczynnik niezbędny jest dodatek chloroformu w celu ekstrakcji białek obecnych w badanej próbce, a także do separacji RNA od DNA poprzez wirowanie prowadzące do rozdziału mieszaniny na frakcje. Górna warstwa wodna wzbogaca się o RNA natomiast

organiczna warstwa dolna w DNA oraz białka. Na granicy faz znajduje się charakterystyczna warstwa pośrednia. Średnio uzyskiwano 0,22 µg całkowitego RNA z 2 ml hodowli *S. aureus* (metoda 1 Tabela 6).

Kolejna testowana procedura pochodziła z publikacji [96], w której zastosowano układ fenol: chloroform, jednak dodatkowym czynnikiem mającym za zadanie zwiększyć efektywność lizy komórek była inkubacja przez 1 godzinę mieszaniny składającej się z hodowli bakteryjnej oraz fenol : etanol w stosunku 5:95 w lodzie. Dodatek kulek szklanych (o średnicy <100 µm); miał także wzmacnić dezintegrację. Średnio uzyskiwano około 150 µg całkowitego RNA z 2 ml hodowli *S. aureus* MRSA (metoda 2, Tabela 6).

Równolegle przetestowano procedurę na podstawie publikacji [186], która również wykorzystuje niski zakres temperaturowy, reagent Trizol oraz kulki szklane dla polepszenia efektywności lizy bakterii. W tym wypadku jednak w pierwszym etapie izolacji hodowlę należało połączyć z mieszaniną aceton : etanol (50:50), a następnie na co najmniej 16 godzin umieścić mieszaninę w temperaturze -80°C. Średnio uzyskiwano około 120 µg całkowitego RNA z 2 ml hodowli *S. aureus* MRSA (metoda 3 Tabela 6).

W kolejnym podejściu do ekstrakcji RNA przetestowane zostały metody izolacji w wysokiej temperaturze, które są rekomendowane dla bakterii wytwarzających biofilm i opornych na dysrupcję. Przy ich zastosowaniu także wykorzystuje się Trizol, fenol oraz działanie mechaniczne. W pierwszym wariantcie (metoda 4, Tabela 6) pobraną hodowlę należało bezpośrednio umieścić w 95°C na czas 10 minut. Po tym czasie i dodatku Trizolu w objętości 1:1 mieszaninę należało wytrząsać i przejść do etapu, w którym dodaje się chloroform. Drugi wariant (metoda 5, Tabela 6) zakładał inkubację hodowli bakteryjnej w temperaturze 95°C z jednoczesnym wytrząsaniem hodowli z dodanym już Trizolem, trzeci zaś wariant (metoda 6, Tabela 6) od drugiego różni się jedynie zastosowaniem fenolu w miejsce Trizolu. Do szeregu testowanych kombinacji metody wykorzystującej wysoką temperaturę dołączono także zastosowanie kulek szklanych (metoda 7, Tabela 6). Modyfikacja ta zakładała, że ich równoległy dodatek z fenolem do hodowli przy wytrząsaniu i zastosowaniu wysokiej temperatury będzie wywierał efekt wzmacniający dezintegrację komórki. Metoda ta ze względu na ilość czynników mających wpływ na efekt końcowy umożliwiła projektowanie protokołów w różnych kombinacjach (metoda 7, Tabela 6) co także zostało przetestowane. Metody te pozwoliły na uzyskiwanie średnio 17 – 100 µg całkowitego RNA z 2 ml hodowli *S. aureus* MRSA.

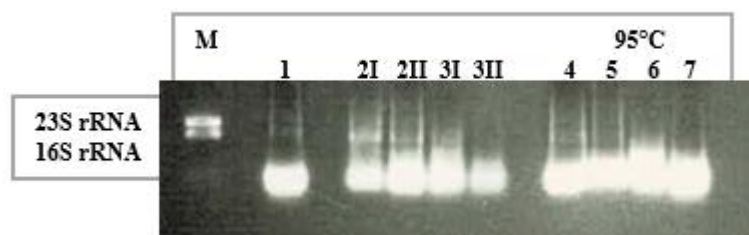
Następne podejście do izolacji RNA ze *Staphylococcus aureus* MRSA bazowało na działaniu enzymatycznym. W pierwszym etapie lizy komórkowej wykorzystano synergistycznie działanie lizozymu oraz lizostafiny. Dodatkowo efekt ten został wzmocniony przez inkubację w temperaturze 37°C. Tak przygotowany lizat można procedować dalej używając komercyjny zestaw izolacyjny (metody 8 i 9, Tabela 6) lub klasyczną metodę fenol/Trizol/chloroform (metoda 10, Tabela 6). Metody 8 i 10 pozwoliły na uzyskiwanie średnio 14 – 15 µg, a metoda 9 – 0,22 µg całkowitego RNA z 2 ml hodowli *S. aureus* MRSA.

W zamieszczonej Tabeli 6 przedstawiono zestawienie uzyskanych spektrofotometrycznie wartości liczbowych odpowiadających czystości oraz stężeniu szeregu przetestowanych metod izolacji RNA. Najniższe stężenie RNA uzyskano w metodzie numer 1 oraz 9. Najwyższe stężenia RNA zostały uzyskane przy pomocy metody 2, 3, 4, oraz 6, jednakże wartości te mogą nie odzwierciedlać rzeczywistego stężenia kwasów rybonukleinowego przez wzgląd na niskie parametry czystości A260/280 oraz A260/230. Eksperymentem potwierdzającym niską jakość uzyskanego RNA metodami od 1 do 7 jest obraz uzyskany poprzez rozdział RNA w żelu agarozowym, przedstawionym na Rysunku 7, gdzie obserwuje się brak prążków na wysokości odpowiadającej 23S rRNA i 16S rRNA.

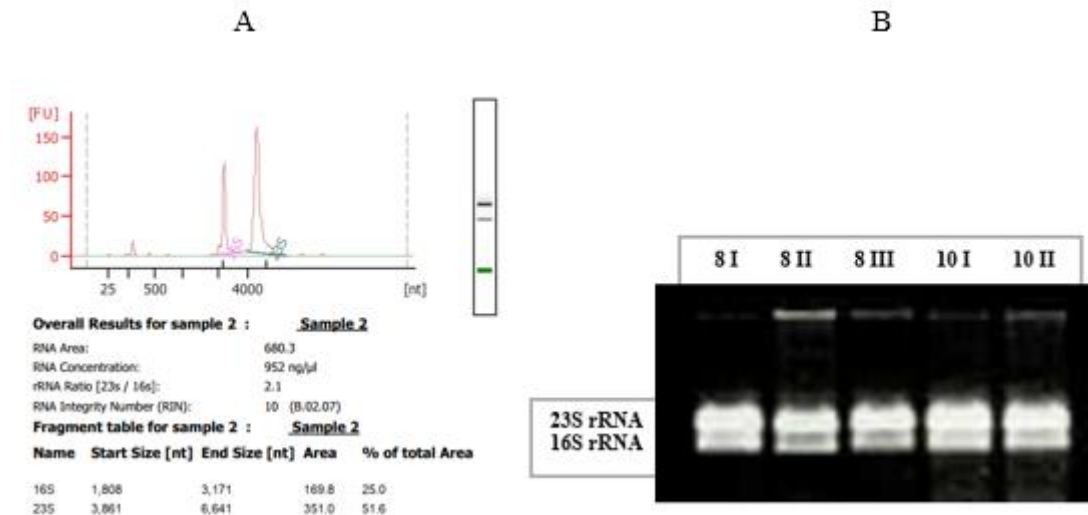
Wartości A260/280 oraz A260/230 wskazujące na wysoką czystość wyizolowanego RNA uzyskano w metodach 8 oraz 10, wykorzystujących aktywność enzymatyczną lizostafiny. Potwierdzeniem dla tego pomiaru jest Rysunek 8 przedstawiający elektroferogram z elektroforezy kapilarnej gdzie wskaźnik RIN (ang. *RNA integration number*) sięga wartości 10, odpowiadając tym samym wysokiej integralności wyizolowanego RNA. Potwierdzenie właściwej jakości oraz ilości wyizolowanego RNA metodą 8 oraz 10 przedstawiono na Rysunku 8, gdzie obserwowalne są wyraźne prążki odpowiadające 23S rRNA i 16S rRNA.

Numer metody	Podstawowy odczynnik	Temperatura	Czynnik wzmacniający lizę	pobrana obj. hodowli	Stężenie RNA [ng/μl]	A260/280	A260/230	Łączna ilość uzyskanego RNA [μg]
1	Trizol	RT	-	2 ml	11	1,60	0,88	0,22
2	Fenol	na lodzie	fenol : etanol, kulki szklane	2 ml	7 668	1,43	0,99	153,36
3	Trizol	-80°C	aceton : etanol kulki szklane	2 ml	6 316	1,41	0,77	126,32
4	Trizol	95°C	-	2 ml	2 643	1,72	1,35	52,86
5	Trizol	95°C	wytrząsanie	2 ml	211	1,70	1,56	42,20
6	Fenol	95°C	wytrząsanie	2 ml	5 492	1,09	1,60	109,84
7	Fenol	95°C	kulki szklane, wytrząsanie	2 ml	880	1,40	0,46	17,60
8	Lizostafyna 3 U Kolumnienka	37°C	lizozym	2 ml	767	2,11	2,07	15,35
9	Lizostafyna 5 U Kolumnienka	37°C	lizozym	2 ml	42	2,08	0,83	0,22
10	Lizostafyna 3 U Trizol	37°C	lizozym	2 ml	740	2,12	2,24	14,80

Tabela 6. Spektrofotometryczna ocena parametrów jakościowych oraz ilościowych całkowitego RNA uzyskanego z *S. aureus* różnymi metodami. Wartości przedstawione w tabeli są średnią z minimum 4 powtórzeń. RT – temperatura otoczenia.



Rysunek 7. Wyniki rozdziału elektroforetycznego w 0,5% żelu agarozowym całkowitego RNA uzyskanego metodami 1, 2, 3, 4, 5, 6 oraz 7. M – marker wielkości, I, II - powtórzenia techniczne.



Rysunek 8. Zestawienie parametrów jakościowych dla całkowitego RNA uzyskanego metodami enzymatycznymi (8 i 10). A - elektroforegram dla RNA wyizolowanego metodą nr 8, B wynik rozdzielania elektroforetycznego w 0,5% żelu agarozowym RNA uzyskanego metodami 8 oraz 10. I, II, III – powtórzenia techniczne.

Dyskusja do 5.1.1

Model wzrostu *Staphylococcus aureus* opiera się na tworzeniu gron i szczelnym obudowywaniu komórek przez ich kolejne warstwy. Gronkowce tworzą zwarte klastry bakteryjne, a dodatkowo otoczone są w polisacharydową kapsułę zwaną biofilmem. Jest to wzbogacona o różne białka [97] ochronna macierz zewnątrzkomórkowa osadzona w glikokaliksie, umożliwiająca komórkom proliferację do wewnątrz [98]. Jego funkcją jest także ograniczenie dyfuzji związków chemicznych ze środowiska zewnętrznego. Jahanshahi i wsp. wskazują, że tworzenie biofilmu w izolatach MRSA jest znacznie wyższe niż w przypadku szczepów wrażliwych MSSA [99]. Największym wyzwaniem w izolacji kwasów nukleinowych w przypadku gronkowca złocistego stanowi ściana komórkowa, będąca trójwymiarową warstwą peptydoglikanu, w której aż 90% peptydów jest usieciowanych przez 4 mostki pentaglicyny, tworząc tym samym sztywną i trwałą otoczkę. Zwiększoną sztywność generują licznie wkomponowane kwasy lipotejchojowe, stanowiące aż 50% suchej masy. Dodatkowo, szczep Mu50 posiada dwukrotnie grubszą ścianę komórkową niż typowy MRSA. Na podstawie analizy biochemicznej oraz uzyskanego obrazu z transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) dowiedziono, że szczep Mu50 wytwarza zwiększone ilości mureiny i może posiadać aż 40 warstw peptydoglikanu [16]. Są to cechy, ze względu na które efektywna liza komórkowa jest szczególnie problematyczna. W przypadku konieczności uzyskania integralnego RNA etap ten jest kluczowy.

Podjmując próbę wytypowania efektywnej metody izolacji przetestowałam szereg wyżej opisanych metod wraz z licznymi kombinacjami, szczegółowego opisu których tutaj nie zawarłam w celu scharakteryzowania jedynie ogólnej zasady działania poszczególnej techniki. Nawiązując do klasycznej metody Trizol (metoda 1, Tabela 6), odzysk kwasu nukleinowego był rzędu kilkunastu - kilkudziesięciu nanogramów w mikrolitrze, oczekiwane zaś wartości to rząd kilkuset do kilku tysięcy nanogramów. Metoda ta nie jest przeznaczona dla trudnych w dezintegracji ściany komórkowej bakterii. W kolejnej technice fenol : etanol na lodzie (metoda 2, Tabela 6) największą trudność sprawiał końcowy osad. Charakteryzował się trudną rozpuszczalnością i nietypową, koloidalną konsystencją. Identyczny efekt przyniosły wszystkie pozostałe metody opierające się na traktowaniu bakterii wysoką temperaturą. W testowanych wariantach dodatek kulek szklanych skutkowało pienieniem się osadu przy próbie rozpuszczenia faz oleistego, białego osadu. Uzyskane ilości RNA sięgające nawet kilku tysięcy nanogramów w mikrolitrze po ponownym oczyszczaniu spadały do wielkości bliskiej błędowi pomiarowemu spektrometru. Pienienie się oraz niskie wartości stosunku absorbancji A260/280, A260/230 mogą wskazywać na pozostałość białek oraz odczynników po izolacji.

Dla pozostałych metod parametry czystości również nie spełniały minimalnych wymogów. Uzyskane obrazy rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym wskazują na niską integralność wyizolowanego RNA (Rysunek 7). Brak prążków w miejscu odpowiadającym 16S rRNA i 23S rRNA, a widoczny pogrubiony prążek u dołu żelu oznaczać może izolację dużej ilości krótkich RNA lub na skrócenie dłuższych odcinków pod wpływem długotrwałego działania wysokich temperatur i agresywnych detergentów. Powtórne próby oczyszczania izolatów poprzez dodatkową precypitację lub zastosowanie komercyjnych zestawów kolumnkowych nie przynosiły pozytywnych rezultatów.

Spośród przetestowanych metod najbardziej efektywna jakościowo oraz ilościowo okazała się być metoda wykorzystująca aktywność enzymatyczną lizostafiny (metoda 8 i 10, Tabela 6). Jest to endopeptydaza wytwarzana przez gronkowca *Staphylococcus simulans*, który angażując tę bakteriocynę zapewnia sobie wzrost i przetrwanie wśród bakteryjnych konkurentów. Wydzielana hydrolaza mureinowa jest specyficznie ukierunkowana na komórki *Staphylococcus aureus* (tylko gronkowce mają mostki krzyżowe pentaglicyny), aby uniknąć nieproduktywnych interakcji z innymi gatunkami bakterii. Enzym ten rozpoznaje i wiąże się z komórkami gronkowca

złocistego; dzięki C-końcowej 92-aminokwasowej domenie, a następnie wykorzystuje aktywność endopeptydazy glicyloglicyny rozszczepiając mostki krzyżowe pentaglicyny w peptydoglikanie, prowadząc do utraty ciśnienia osmotycznego [100]. W przypadku *Staphylococcus aureus* obecność modyfikacji O acetylacji w pozycji C-6 kwasu N-acetylmuraminowego wpływa na znaczne obniżenie wydajności enzymatycznej lizozymu, co wyklucza go jako jedyne źródło o właściwościach lizujących [101].

Spośród różnych stężeń lizostafiny dodatek 3 jednostek okazał się ilością optymalną. Każde wyższe stężenie skutkowało mniejszym uzyskiem kwasu nukleinowego, co mogło być spowodowane zbyt intensywnym rozpadem komórek i wpływem endogennych RNaz na swobodnie zawieszona RNA (metoda 9, Tabela 6). Zarówno parametr A260/280 przedstawiony w Tabeli 6 jak i elektroferogram (Rysunek 8) wskazują na wysoką czystość i jakość uzyskanego kwasu nukleinowego.

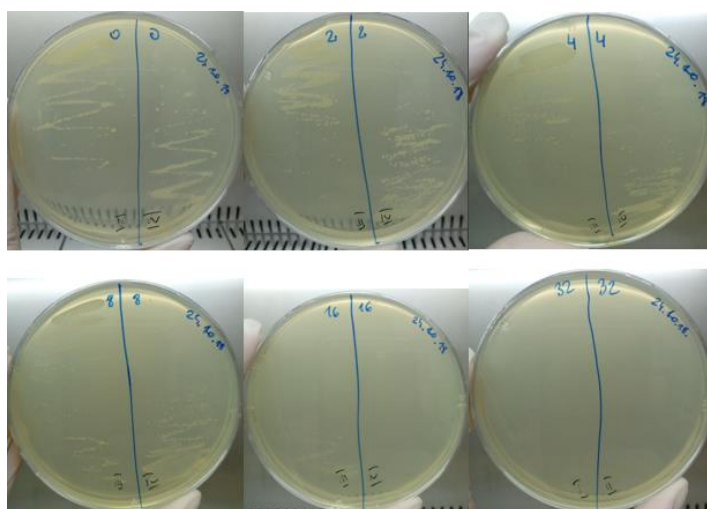
5.1.2 Wyznaczenie minimalnego stężenia inhibującego dla wankomycyny.

Minimalne stężenie inhibujące MIC definiuje się jako najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, przy którym obserwowane jest zahamowanie wzrostu drobnoustrojów. Wyznaczenie tej wartości odbywa się po całonocnej hodowli i jest uważane za złoty standard w określaniu wrażliwości mikroorganizmów na antybiotyki i inne środki hamujące wzrost. Metoda ta jest szeroko wykorzystywana przez laboratoria diagnostyczne głównie w celu określania oporności na antybiotyki.

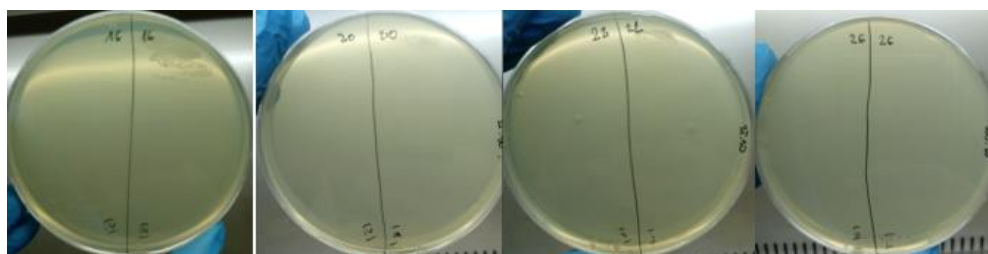
W celu wyznaczenia minimalnego stężenia inhibującego wankomycyny dla *Staphylococcus aureus* MRSA poczyniłam serię posiewów na podłoża stałe jak i płynne z mikrorozcieńczeniami wankomycyny, jak opisano w rozdziale 4.5.5. Motywacją do zastosowania antybiotyku wankomycyna jest fakt, że szczep Mu50 wykorzystywany do badań wykazuje w jego kierunku obniżoną wrażliwość, a także jest to lek ostatniej szansy wykorzystywany w leczeniach zakażeń wywołanych metycylinoopornym szczepem gronkowca złocistego [102].

Dobór stężeń na podłożu stałe został ustalony zgodnie z wytycznymi zawartymi w publikacji Andrewa [103], gdzie sugerowany zakres stężeń dla rodzaju *Staphylococci* zawiera się w przedziale od 0,06 – 32,00 mg/l, a wartości MIC została odczytana ręcznie po 24 godzinach inkubacji. Na tej podstawie wykonane zostały rozcieńczenia wankomycyny na podłożu stałym wynoszące kolejno: 0,0 mg/l, 0,06 mg/l, 0,125 mg/l, 0,25 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16mg/l oraz 32 mg/l. Wzrost hodowli

zaobserwowano w każdym z wykonanych stężeń za wyjątkiem 32 mg/l (Rysunek 9). Na tej podstawie określony został wstępny zakres inhibujący wzrost kolonii. W celu uściślenia wartości, przy której obserwuje się zanik wzrostu wykonano kolejną serię rozcieńczeń, poczynając od 16 mg/l zwiększając stężenie o 2, aż do 32 mg/l. Całkowity zanik wzrostu kolonii zaobserwowano przy stężeniu 26 mg/l (Rysunek 10).

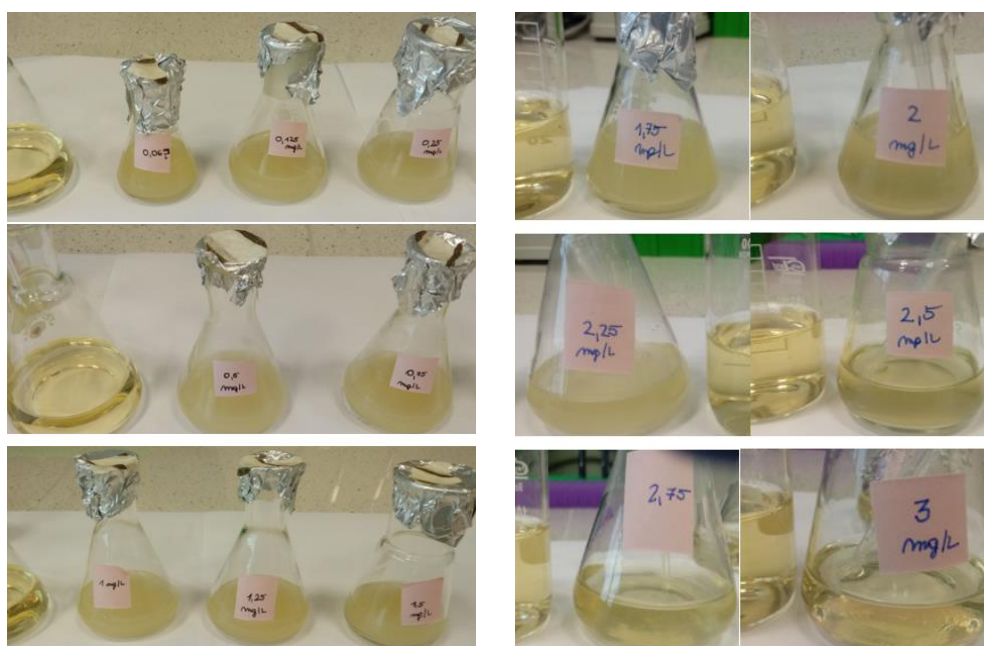


Rysunek 9. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u *Staphylococcus aureus* MRSA dla wankomycyny na podłożu stałym. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 0 mg/l, 2 mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l oraz 32 mg/l. Linia środkowa dzieląca płytkę wyznacza powtórzenia na płytce, cyfry rzymskie oznaczają powtórzenia pomiędzy płytkami.



Rysunek 10. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u *Staphylococcus aureus* MRSA dla wankomycyny na podłożu stałym. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 16 mg/l, 20 mg/l, 22 mg/l oraz 26 mg/l. Linia środkowa dzieląca płytkę wyznacza powtórzenia na płytce, cyfry rzymskie oznaczają powtórzenia pomiędzy płytkami.

Równolegle określałam MIC standardową metodą rozcieńczeń bulionu (Rysunek 11). Metoda ta jest zalecana w określaniu wrażliwości gronkowców na glikopeptydy przez EUCAST (ang. *European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing*). Minimalne stężenie inhibujące zdefiniowałam jako najniższe stężenie środka przeciwdrobnoustrojowego, które hamuje wzrost bakterii. Wartość tę określałam przez przygotowanie roztworów wankomycyny o rosnących stężeniach i ocenę wzrokową (okiem nieuzbrojonym) gęstości hodowli *S. aureus* MRSA we wzrastającym stężeniu antybiotyku [104].



Rysunek 11. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u *Staphylococcus aureus* MRSA dla wankomycyny metodą mikrorozcieńczeń bulionu. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 0,06 mg/l, 0,125 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 0,75 mg/l, 1 mg/l, 1,25 mg/l, 1,5 mg/l, 1,75 mg/l, 2 mg/l, 2,25 mg/l, 2,5 mg/l, 2,75 mg/l, 3 mg/l. W każdym rzędzie najbardziej po lewej stronie, umieszczono jako odnośnik pożywkę bez bakterii.

Wartość minimalnego stężenia inhibującego dla wankomycyny u *Staphylococcus aureus* MRSA jest różna dla hodowli na podłożu stałym i płynnym. Wyznaczona wartość MIC dla hodowli płynnej wynosi 2 mg/l. Jest to stężenie przy którym obserwowalne jest zahamowanie wzrostu *S. aureus* MRSA w hodowli płynnej.

Dyskusja do 5.1.2

Ze względu na udokumentowane przypadki z całego świata pacjentów, u których terapia wankomycyną zakończyła się niepowodzeniem lekarze oraz mikrobiolodzy

poddali ponownej weryfikacji wartości MIC dla tego antybiotyku [19]. Jak wynikało ze statystyk, jeśli wartość ta przekraczała 2 mg/l leczenie było utrudnione w stopniu znacznym lub nieskuteczne. Przez wzgląd na to, EUCAST w 2010 roku zmienił punkty odcięcia wartości MIC, na podstawie których dokonywana była klasyfikacja poziomu oporności. W chwili obecnej według aktualnych danych EUCAST, graniczne wartości dla szczepów wrażliwych i opornych pokrywają się, zaś przedział środkowy (obniżona wrażliwość) jako kryterium zostało wykluczone (Tabela 7). Ponadto, zgodnie z raportem zamieszczonymi przez Ghahremani i wsp. pojedynczy szczep określić można fenotypowo jako VISA, a jednocześnie na podstawie analizy molekularnej jako VRSA. Doniesienia te budzą poważne obawy w odniesieniu do środków kontroli i wiarygodności testów laboratoryjnych służących do badań przesiewowych szczepów opornych [105].

Rok	EUCAST			CLSI		
	MIC wankomycyny (mg/l)			MIC wankomycyny (mg/l)		
	S	I	R	S	I	R
2009	≤ 4	8	16	≤ 2	4 - 8	≥ 16
2010	≤ 1	2	≥ 4	≤ 2	4 - 8	≥ 16
2011	≤ 2	-	≥ 4	-	-	-
2013	≤ 2	-	≥ 4	-	-	-
2022	≤ 2	-	> 2	≤ 2	4 - 8	≥ 16

Tabela 7. Kryteria oporności na wankomycynę u *Staphylococcus aureus*, zgodnie z wytycznymi EUCAST oraz CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) w latach 2009 – 2022. S – szczep wrażliwy, I- szczep o obniżonej wrażliwości, R – szczep oporny

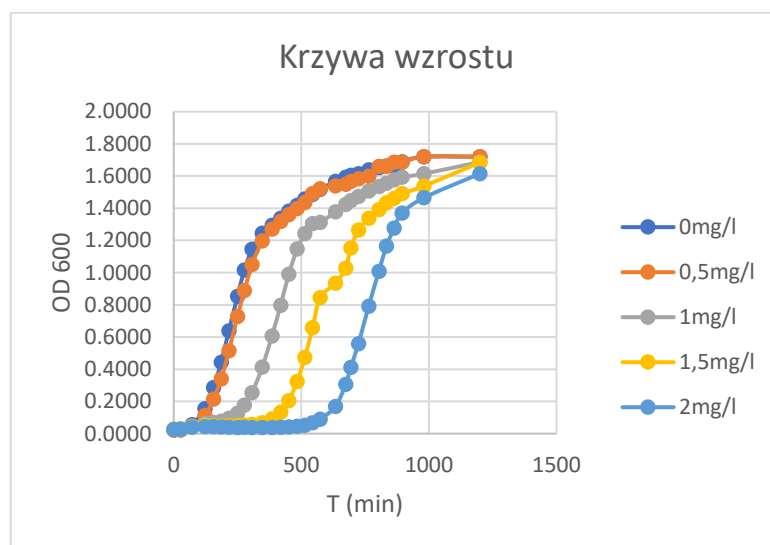
Zestawienie danych płynących ze świata i obserwacji laboratoryjnych wykonywanych na potrzeby niniejszej rozprawy doktorskiej poskutkowało wyborem MIC 2 mg/l do dalszych działań badawczych. Jest to stężenie, przy którym obserwowalne jest hamowanie wzrostu w hodowli płynnej, a także wartość ta jest uznawana za graniczną w klasyfikacji oporności. Stężenie to jest wystarczające, aby wzmocnić i aktywować procesy adaptacyjne w komórce. Dodatkowo, zamieszczone przez EUCAST statystyki pochodzące ze stycznia 2023 roku zbierane z wielu źródeł i obszarów geograficznych wskazują, że największa ilość przypadków MRSA z MIC dla wankomycyny mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0 mg/l [106].

5.1.3 Krzywa wzrostu *Staphylococcus aureus* MRSA

Mając na uwadze kolejne zadania badawcze, w tym sekwencjonowanie nowej generacji koniecznym było wyznaczenie krzywej wzrostu dla hodowli płynnej *Staphylococcus aureus* MRSA w celu określenia logarytmicznej fazy wzrostu. Jest to faza charakteryzująca się niewielkimi zanieczyszczeniami w pożywce, a dzielące się komórki przechodzą adaptację do nowych warunków środowiska. Dodatkowo, znaczna część genów kontrolowanych przez ryboprzełączniki jest najbardziej aktywna transkrypcyjnie w fazie wzrostu wykładniczego. Pomiarów wykonywane były dla pięciu hodowli bakteryjnych prowadzonych we wzrastającym stężeniu wankomycyny od 0 mg/l, aż do wcześniej wyznaczonej wartości MIC 2 mg/l. Wykonanie pomiarów rozpoczęto od wstępnego namnożenia bakterii w hodowli płynnej bakterii przechowywanych w temperaturze -80°C. Następnie, za pomocą ezy, rozchodowane bakterie przesiane zostały na podłoże stałe (płytkę agarową) i pozostawione do wyrośnięcia przez noc w 37°. Po tym czasie pobrano pojedynczą kolonię i namnożono w zdefiniowanej pożywce płynnej z dodatkiem wankomycyny o odpowiednio zadanym stężeniu: 0,0 mg/l, 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l oraz 2,0 mg/l. Zachowane zostały warunki tlenowe oraz ograniczono dostęp promieni słonecznych. Co 30 minut pobierano 1 ml próbki celem wyznaczenia OD (ang. *optical density*), gęstości optycznej mierzonej przy długości fali 600 nm. Hodowle prowadzone były do momentu osiągnięcia fazy stacjonarnej wzrostu. Dodatkowo, dla każdego z warunków obliczony został czas generacji przy pomocy programu GraphPad Prism 8. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresie (Rysunek 12) i w tabeli (Tabela 8).

Stężenie wankomycyny	0,0 [mg/l]	0,5 [mg/l]	1,0 [mg/l]	1,5 [mg/l]	2,0 [mg/l]
Czas generacji	47,19 min	45,07 min	59,91 min	63,78 min	64,88 min

Tabela 8. Czas generacji dla bakterii *Staphylococcus aureus* MRSA hodowanych w obecności zróżnicowanego stężenia wankomycyny, od 0 mg/l do 2 mg/l.



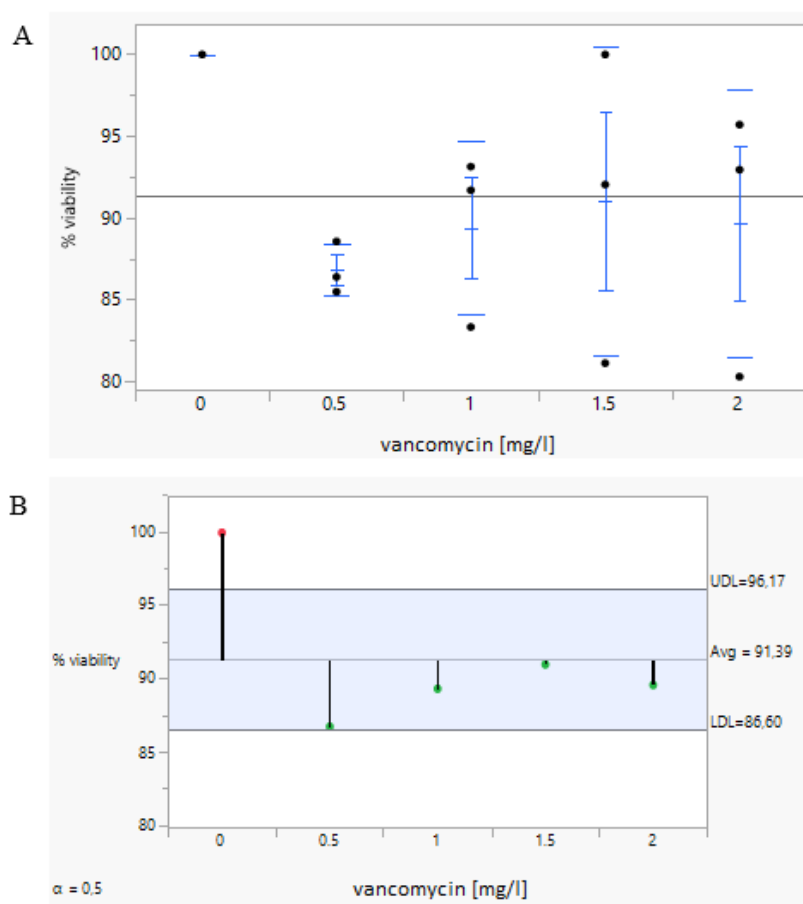
Rysunek 12. Krzywa wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* MRSA dla hodowli prowadzonych w obecności zróżnicowanego stężenia wankomycyny, od 0 mg/l do 2 mg/l.

Uzyskane wyniki wskazują, że czas generacji dla bakterii hodowanych w coraz wyższych stężeniach wankomycyny jest dłuższy, niż dla bakterii hodowanych w niższym stężeniu wankomycyny. Ma to bezpośredni związek z procesem adaptacyjnym do stresu antybiotykowego, a także selekcją środowiskową komórek zdolnych do przeprowadzenia procesów umożliwiających wykształcenie fenotypu o zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę VISA. Wyniki te są zgodne z doniesieniami zamieszczonymi w literaturze [107]. Z uzyskanej krzywej wzrostu wynika, że logarytmiczna faza wzrostu zaczyna się od $OD_{600} = 0,2$, która uzyskiwana jest w czasie 145 minut dla hodowli kontrolnej, 160 minut dla hodowli z 0,5 mg/l wankomycyny, 300 minut dla hodowli z 1 mg/l wankomycyny, 451 minut dla hodowli z 1,5 mg/l wankomycyny oraz 746 minut dla hodowli z 2 mg/l wankomycyny. Przechodzenie w stacjonarną fazę wzrostu rozpoczyna się od $OD_{600} = 1,2$ dla hodowli kontrolnej w 330 minucie, w 350 minucie dla hodowli z 0,5 mg/l, w 510 minucie dla hodowli z 1 mg/l wankomycyny, w 715 minucie dla hodowli z 1,5 mg/l wankomycyny oraz 840 minucie dla 2 mg/l wankomycyny.

5.1.4 Analiza aktywności metabolicznej *S. aureus*.

W praktyce mikrobiologicznej wykorzystuje się różnorodne wskaźniki stanu fizjologicznego bakterii, które mają definiować ich żywotność. Jeden z najprostszych testów do śledzenia aktywności metabolicznej komórek podczas hodowli wykorzystuje

bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT), rozpuszczalny w wodzie żółty barwnik, który przez system aktywnych dehydrogenaz można zredukować do nierozpuszczalnych w wodzie fioletowych kryształów formazanu [108]. Można je oznaczyć ilościowo spektrofotometrycznie w obecności rozpuszczalnika organicznego, gdyż ich stężenie jest wprost proporcjonalne do liczby komórek metabolicznie aktywnych. Pierwotnie protokół MTT opracowany został w celu określania żywotności adherentnych komórek zwierzęcych, natomiast obecnie stosowany jest również do pomiaru wzrostu i przeżywalności u mikroorganizmów. Za jego pomocą oznaczana jest wrażliwość grzybów na leki przeciwgrzybicze [109] oraz antybiotykooporność u bakterii [110]. W celu określenia przeżywalności bakterii *Staphylococcus aureus* w warunkach stresu antybiotykowego dokonano pomiarów w trzech powtórzeniach biologicznych. Uzyskane wartości zgodnie z równaniem określonym w punkcie 4.5.7. zostały przeanalizowane w programie jmp i przedstawione w formie procentowej na Rysunku 13. Przeżywalność bakterii *Staphylococcus aureus* w żadnym z warunków nie spadła poniżej 80%. Jej najniższą wartość obserwowano w hodowli o stężeniu wankomycyny 2 mg/l. Na Rysunku 13 obserwowany jest spadek żywotności hodowli już przy najniższym stężeniu wankomycyny 0,5 mg/l, a każde wyższe stężenie antybiotyku promuje mechanizmy adaptacyjne komórek, aż do najwyższego stężenia, gdzie wartość ta ponownie spada. Z analizy statystycznej otrzymanych wartości przeżywalności wynika, że różnice w przeżywalności hodowli *S. aureus* MRSA w zróżnicowanym stężeniu antybiotyku wankomycyny w przedziale 0 – 2 mg/l nie są istotne statystycznie.



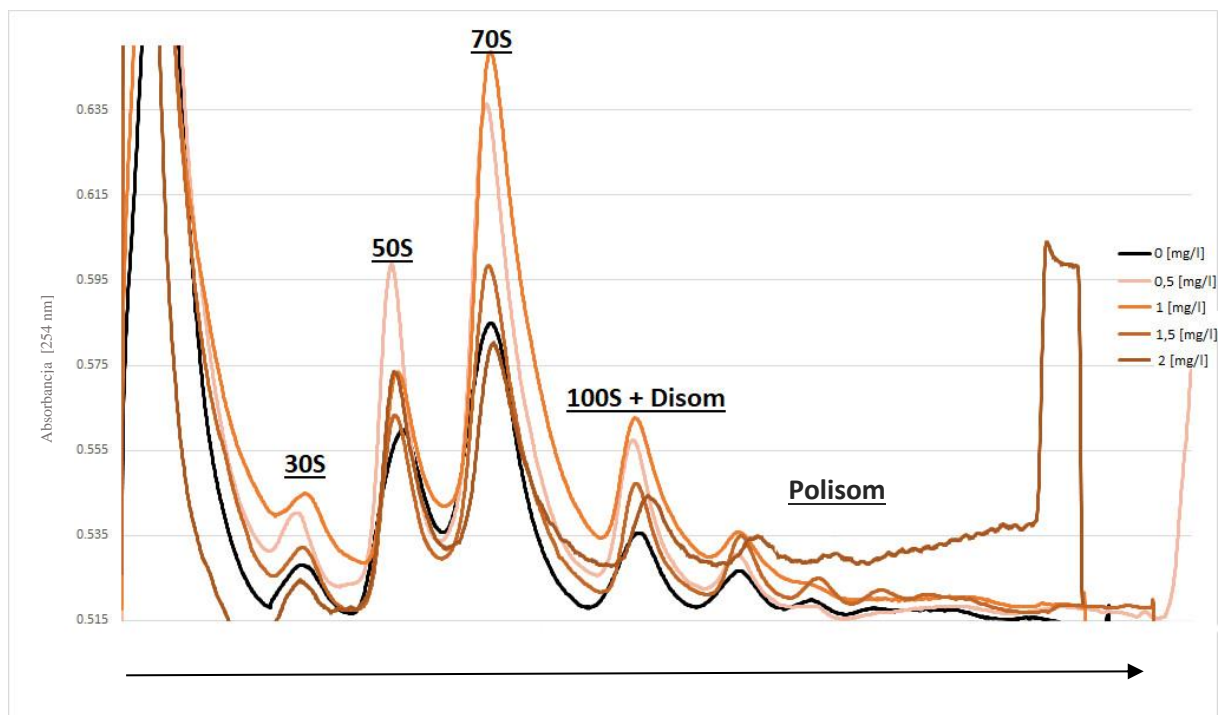
Rysunek 13. Przeżywalność *Staphylococcus aureus* MRSA w warunkach stresu antybiotykowego wankomycyną. Zastosowano antybiotyk w stężeniach 0,0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l.

5.1.5. Określenie zmian w aktywności translacyjnej *S. aureus* MRSA, będącej odpowiedzią na stres antybiotykowy.

Frakcjonowanie rybosomów w gradiencie sacharozy jest metodą umożliwiającą oszacowanie globalnego poziomu translacji poprzez analizę profili polisomowych. Polega ona na uzyskaniu z lizatu komórkowego frakcji rybosomowej, a następnie zwirowaniu jej w gradiencie sacharozowym, umożliwiając kontrolowany rozdział składowych na następujące po sobie frakcje, zgodnie z ich współczynnikiem sedymentacji. Na rozdzielonej próbce przeprowadza się ocenę jakościową oraz ilościową przy pomocy wyposażonego w spektrofotometr kolekcjonera frakcji, który w trakcie separacji kolejno następujących po sobie warstw emituje wiązkę światła o długości 254 nm i rejestruje absorbancję w sposób liniowy.

W celu określenia zmian w aktywności translacyjnej pozyskane zostały lizaty komórkowe pochodzące z hodowli *S. aureus* prowadzonych w różnych stężeniach

wankomycyny jak opisano w rozdziale 4.5.8. Z uwagi na niestabilny charakter polisomów konieczne było utrzymanie odpowiednio niskich warunków temperaturowych umożliwiających zachowanie natywnej struktury rybosomów. Natychmiastowe zmrożenie zwiększa odsetek aktywnych translacyjnie polisomów, gdyż zapobiega zwiększonej akumulacji monomerów 70S powstałych w wyniku rozpadu polisomów [111]. Dodatkowo, aby uchwycić profil rybosomowy z wybranego punktu logarytmicznej fazy wzrostu zastosowano dodatek chloramfenikolu. Jest to antybiotyk, który wiążąc się z tunelem wyjścia polipeptydu dużej podjednostki rybosomu w pobliżu centrum peptydylotransferazowego hamuje translację poprzez fizyczne blokowanie elongacji powstającego polipeptydu [112]. Do przeprowadzenia tej analizy zoptymalizowano metodę dezintegracji komórek, która zgodnie z doniesieniami literaturowymi i wykonaną praktyką jest wyjątkowo wymagającym etapem. Wyzwanie stanowi konieczność sproszkowania w warunkach bezpieczeństwa zmrożonego osadu metycylinoopornego szczepu gronkowca złocistego przy jednoczesnym zachowaniu powtarzalnej jakości uzyskanego lizatu. Spośród testowanych metod na podstawie danych literaturowych wybrana została metoda wykorzystująca zmechanizowane rozbijanie osadu oraz mrożenie ciekłym azotem. Na zamieszczonym wykresie (Rysunek 14) zestawiono uzyskane profile polisomowe pochodzące z bakterii hodowanych w obecności antybiotyku o stężeniu od 0,5 mg/l do 2 mg/l.



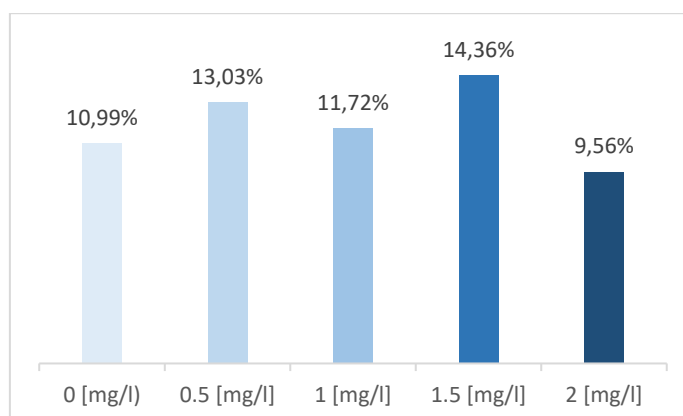
Rysunek 14. Charakterystyka zmian aktywności translacyjnej będącej odpowiedzią na stres antybiotykowy metycylinoopornego szczepu *Staphylococcus aureus* MRSA. Oś y reprezentuje absorbancję przy długości fali 254 nm, Oś x reprezentuje kierunek gradientu sacharazowego (wzrastające stężenie sacharozy).

Dyskusja do 5.1.4 i 5.1.5

Biosynteza białek jest najbardziej energochłonnym procesem komórkowym. Supresja translacji podczas stresu środowiskowego jest uniwersalnym mechanizmem adaptacyjnym stosowanym przez wszystkie żywe organizmy w celu ograniczenia wydatkowania energii [113]. Planując w dalszej perspektywie sekwencjonowanie NGS należało upewnić się, że w hodowli poddanej stresowi antybiotykowemu na poziomie $MIC_{\text{wankomycyny}} = 2 \text{ mg/l}$ maszyna translacyjna pozostaje aktywna. Profil polisomowy uzyskany z hodowli o tym stężeniu wskazuje na obecność polisomów w ilości nie różniącej się od innych warunków, co wskazuje na wysoką aktywność translacyjną (Rysunek 14).

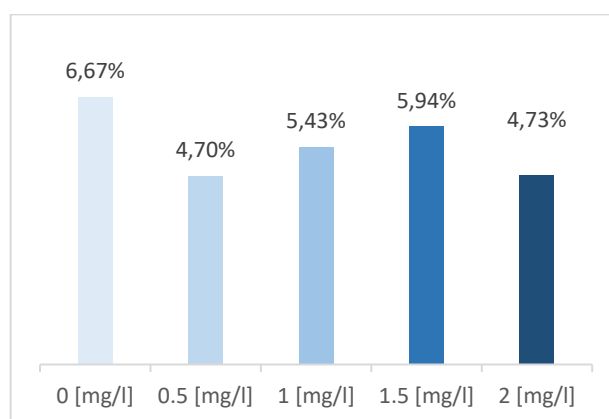
Zjawiskiem niespotykanym u innych bakterii, zaś typowym dla *Staphylococcus aureus* jest obecność kompleksów 100S w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu. Rybosomy te zwane inaczej rybosomami hibernującymi składają się z dwóch monomerów 70S połączonych małą podjednostką 30S, a w ich tworzeniu uczestniczy HPF_{sa} - czynnik sprzyjający hibernacji [114, 115]. Jak dotąd wiadomo, u większości bakterii obecność kompleksów 100S związana jest z wejściem w fazę stacjonarną, gdy następuje wyhamowanie wzrostu oraz pojawienie się czynników stresowych. Wówczas

100S stanowią rezerwuuar rybosomów zdolnych do natychmiastowej dysocjacji i wznowienia translacji w zaistnieniu warunków ponownie sprzyjających. Badania wskazują, że żywotność bakterii pozbawionych możliwości tworzenia rybosomów hibernujących poprzez delecję czynnika HPF jest ograniczona. [116]. Na tej podstawie wnioskować można, że konwersja tych struktur jest ważną strategią przetrwania bakterii i umożliwia efektywną reakcją na stres. Na Rysunku 15 przedstawiona została zawartość procentowa rybosomów 100S w poszczególnych warunkach. Ich najniższy udział obserwowany jest w warunku z najwyższym stężeniem wankomycyny (2 mg/l). Obserwacja ta może być potwierdzeniem wykorzystania rybosomów 100S przy zmianie aktywności translacyjnej w wyniku stresu wywołanego obecnością czynnika zewnętrznego - antybiotyku. Obserwowalną tendencją jest również wzrost udziału rybosomów 100S w stosunku do pozostałych frakcji w danym warunku po wprowadzeniu do hodowli wankomycyny.



Rysunek 15. Procentowa zawartość rybosomów 100S w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu u *Staphylococcus aureus* MRSA hodowanego w różnych stężeniach wankomycyny.

Poziom aktywności translacyjnej w poszczególnych warunkach został przedstawiony poglądowo na Rysunku 16 jako zawartość ilościowa polisomów stanowiących procent wszystkich frakcji rybosomowych w danym warunku. Wartość ta jest najniższa w hodowlach z wankomycyną o stężeniu 0.5 mg/l oraz 2 mg/l. Obserwowany spadek aktywności translacyjnej w tych warunkach może wynikać ze spowolnienia metabolicznego, niezbędnego do wprowadzenia zmian adaptacyjnych. Przy stężeniu wankomycyny 0,5 mg/l jako pierwotnej reakcji na pojawienia się czynnika stresowego oraz przy stężeniu 2 mg/l, które istotnie zaburza prawidłowe funkcjonowanie komórki.



Rysunek 16. Procentowa zawartość aktywnych translacyjnie polisomów w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu u *Staphylococcus aureus* MRSA hodowanej w różnych stężeniach wankomycyny.

Analizą uzupełniającą do oceny aktywności komórkowej bakterii było przeprowadzenie testów przeżyciowych z wykorzystaniem soli tetrazolowej. Zgodnie z informacjami źródłowymi zastosowanie testów MTT do prokariotów jest obciążone dużym prawdopodobieństwem błędnej interpretacji wyników. Właściwość ta wynika z faktu, że wartości te mogą być różne dla tego samego szczepu w zależności od jednego z dwóch powszechnie stosowanych w mikrobiologii warunków doświadczalnych, test płytkowy z komórkami rosnącymi lub płynny – spoczynkowy. W obu testach redukcja soli tetrazolowej wynika z transferu elektronów z donora wewnątrzkomórkowego (głównie NADH) do soli poprzez łańcuch transportu elektronów, ale miejsca redukcji już zależą od warunków eksperymentalnych. W przypadku zastosowanego testu płynnego redukcja fioletu soli zachodzi w wewnętrznej części membrany, gdzie zlokalizowane są dehydrogenazy membranowe i ma to bezpośredni związek z wewnątrzkomórkową pulą NADH. W testach płytkowych redukcja soli zachodzi głównie poza komórką, a także w zewnętrznej części błony plazmatycznej [117]. Na tej podstawie dokładniejszym określeniem dla zastosowanego testu płynnego jest oznaczenie puli NADH w komórce. Z uzyskanych wyników odczytać można, że dodatek antybiotyku wpływa na obniżenie aktywności metabolicznej w porównaniu do próby kontrolnej. Różnica pomiarów w hodowlach z wzrastającym stężeniem wankomycyny nie jest istotna statystycznie, a jej poziom utrzymuje się w zakresie od 85% do 90% aktywności metabolicznej hodowli kontrolnej.

Zestawiając wyniki uzyskane z frakcjonowania rybosomów i testu przeżyciowego MTT obserwowalna jest korelacja. Zarówno przeżywalność jaki i aktywność translacyjna

spada już przy najniższym stężeniu wankomycyny. Wartości pomiarowe obu analiz dla najwyższego stężenia antybiotyku (2 mg/l) wskazują na zauważalną zmianę w przebiegu procesów życiowych bakterii, a jednocześnie nie odbiegają znacząco od kontroli, co promuje wybór tego stężenia do dalszych badań.

5.2. Sekwencjonowanie metodą Term- seq.

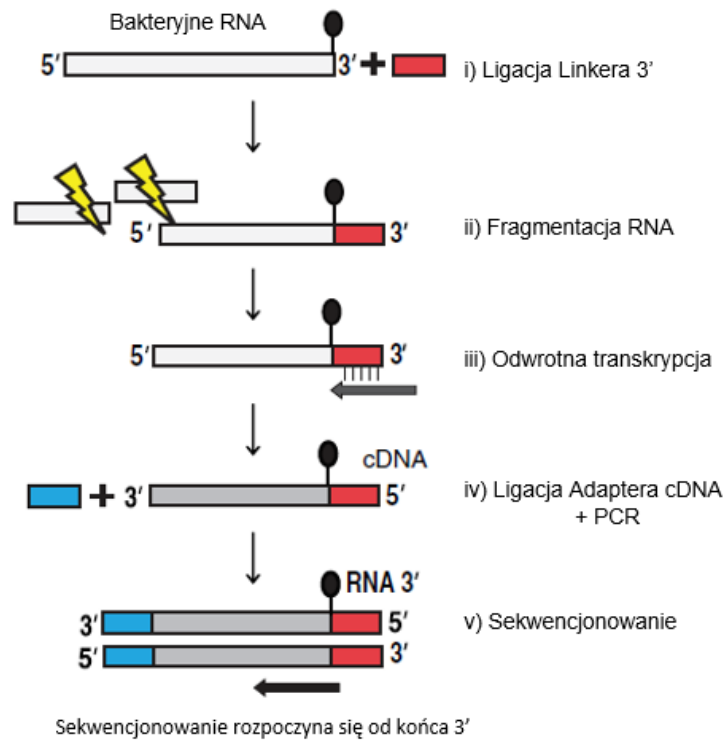
W procesie identyfikacji mechanizmów regulatorowych RNA niezwykle ważnym sygnałem z transkryptomu są zdarzenia terminacji transkrypcji. Przedwczesna terminacja transkrypcji jest jednym z dominujących mechanizmów wykorzystywanych przez bakterie w kontroli kluczowych procesów komórkowych, w tym metabolizmu podstawowego, ruchliwości, tworzenia biofilmu, wirulencji oraz antybiotykooporności. Taki model regulacji reprezentowany jest przez atenuatory i ryboprzełączniki. Są to elementy RNA znajdujące się w regionach 5' niepodlegających translacji (5'UTR) i pełnią funkcje *cis* regulacyjne poprzez wykrywanie konkretnych metabolitów, aminokwasów, nukleotydów oraz jonów [118]. Mechanizm kontroli opiera się na generowaniu specyficznego, zależnego od warunków środowiskowych terminatora lub antyterminatora. Dotychczas scharakteryzowano około 25 klas naturalnie występujących ryboprzełączników, choć szacowania względem ich liczebności sięgają rzędu setek [119]. Prawie wszystkie spośród znanych ryboprzełączników odkryte zostały przy pomocy podejść opartych na genomice porównawczej obszarów międzygenowych różnych typów bakterii [120]. Zidentyfikowanie konserwatywnego regionu 5' jako potencjalnego regulatora uruchamia przewidywania na temat ligandu w powiązaniu z funkcją genu pod kontrolą którego się znajduje, a następnie wnioskowanie to poddaje się weryfikacji *in vitro*. Podejście takie prowadzi do wykrycia ryboprzełączników zachowanych w szerokim zakresie filogenetycznym [119]. Niemniej jednak podejście to jest niewystarczające przy identyfikacji regulatorów indukujących na przykład mechanizmy oporności na antybiotyki. Większość elementów, które nie zostały jeszcze odkryte jest ograniczona do konkretnych grup bakterii przystosowanych do specyficznych warunków środowiskowych. Potrzeba opracowania nowej eksperymentalnej metody umożliwiającej odkrycie ryboprzełączników i regulatorów warunkowej terminacji transkrypcji na skalę genomową wyprowadziła metodę Term-seq. Opracowane przez Dar Daniela i zespół badawczy podejście eksperymentalne zakłada możliwość identyfikacji warunkowej regulacji transkrypcji w skali całego genomu bakteryjnego. W przeciwieństwie do

eukariotycznego RNA, gdzie obecność uniwersalnego ogona poliA stanowi bezpośredni starter końca 3' dla odwrotnej transkrypcji u bakterii brak poliadenylacji 3' w mRNA sprawia, że mapowanie naturalnych końców 3' stanowi wyzwanie. Opracowany protokół dla sekwencjonowania RNA Term-seq polega na ligacji linkera do końców 3' transkryptów, a następnie losowej fragmentacji RNA i ligacji adapterów 5'. Po odwrotnej transkrypcji i amplifikacji cDNA w bibliotece znajdują się wyłącznie cząsteczki cDNA zawierające oba adepty 5' oraz 3', które odzwierciedlają końce transkryptów, umożliwiając tym samym identyfikację dokładnego położenia końców 3'. Zastosowane podejście umożliwiło wykrycie licznych regulatorów RNA biorących udział w kontroli genów warunkujących antybiotykooporność. U patogennej bakterii *Listeria monocytogenes* zidentyfikowano mechanizm atenuacji, w którym pośredniczy zatrzymany na skutek działania antybiotyku rybosom. Opracowana metoda dostarczyła narzędzia do eksperymentalnego odkrywania ryboprzełączników i atenuatorów bakteryjnych [4].

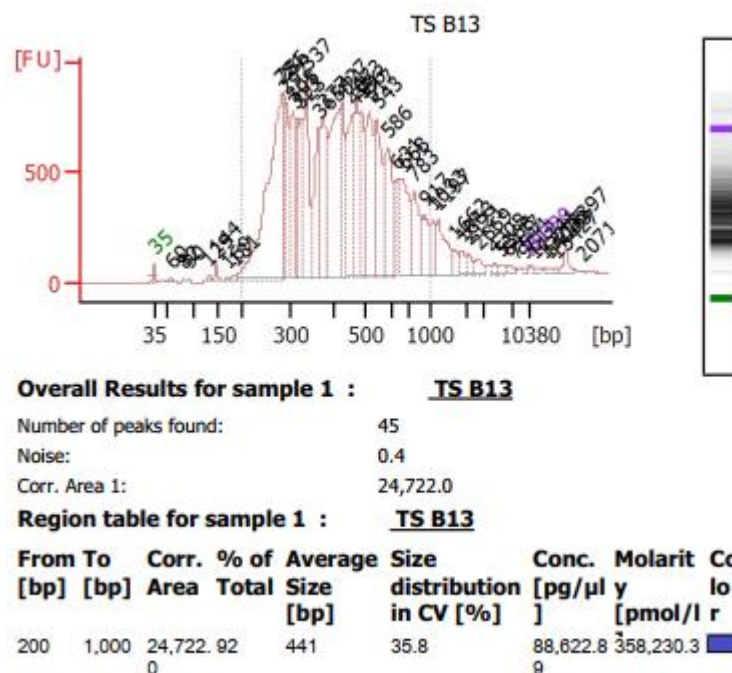
5.2.1 Przygotowanie bibliotek cDNA do sekwencjonowania Term-Seq.

Posiadając zoptymalizowane warunki hodowli oraz wydajną metodę izolacji RNA, utworzona została biblioteka do sekwencjonowania dla hodowli *S. aureus* MRSA z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l oraz kontroli, bez wankomycyny. Przed przystąpieniem do właściwego protokołu Term-seq przeprowadzone zostało oczyszczanie RNA z pozostałości DNA (ang. *DNase treatment*), a także wzbogacenie biblioteki o cząsteczki mRNA przez usunięcie rRNA przy użyciu zestawu MICROBExpress, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 4.5.9. Pierwszym etapem przygotowania bibliotek była ligacja linkera do wszystkich naturalnych końców 3' (Tabela 3). Linkery zawierały sekwencję komplementarną do starterów, przy użyciu których przeprowadzona została reakcja odwrotnej transkrypcji na dalszym etapie. Po przeprowadzeniu etapu drugiego, którego celem była fragmentacja transkryptów RNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu SuperScript II oraz startera RT (Tabela 3). W jej wyniku utrwalone zostało miejsce zakończenia transkrypcji. Celem oznaczenia amplikonów przeprowadzona została kolejna ligacja adaptera oraz amplifikacja utworzonej biblioteki zgodnie ze schematem zamieszczonym na rysunku (Rysunek 17). Ligacja linkera i przeprowadzenie odwrotnej transkrypcji umożliwiło oznaczenie i utrwalenie naturalnych końców 3' transkryptów. Dzięki temu początek odczytu każdego fragmentu cDNA na sekwenatorze odzwierciedlał naturalny

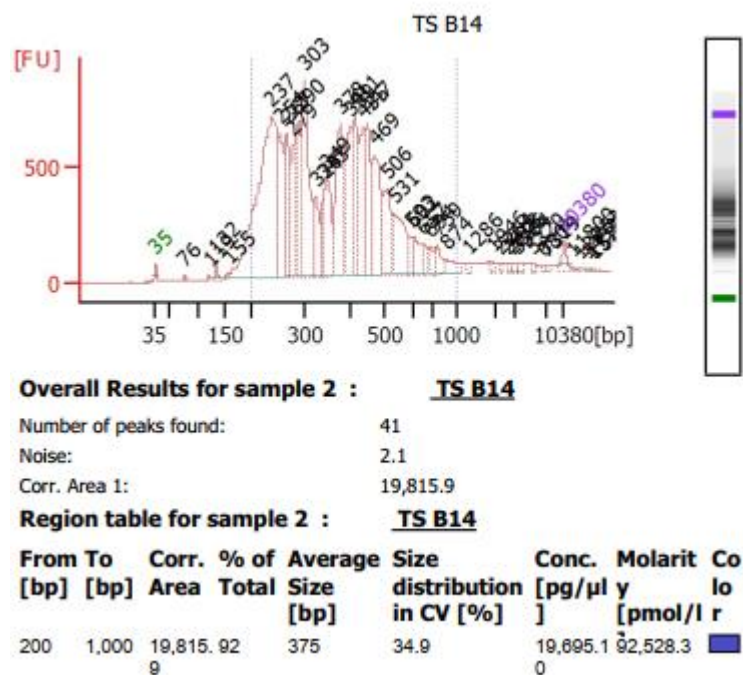
koniec 3' cząsteczki RNA, z której został przepisany. Na każdym etapie tworzenia bibliotek przeprowadzane było oczyszczanie oraz selekcja wielkości przy pomocy reagentu AMPure XP, opierającego się na technologii kulek paramagnetycznych. Po ostatnim oczyszczaniu przeprowadzona została analiza jakościowa i ilościowa bibliotek Term-seq przy użyciu analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer System. Na podstawie uzyskanych elektroforegramów (Rysunek 18 i 19) potwierdzona została skuteczna amplifikacja fragmentów cDNA o oczekiwanej długości od około 250 do 1500 nt. Wszystkie biblioteki zostały rozcieńczone do stężenia 2 nM. Sekwencjonowanie zostało wykonane przez firmę FASTERIS mieszczącą się w Plan-les-Ouates w Szwajcarii.



Rysunek 17. Schemat postępowania Term-seq na podstawie publikacji „Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria” autorstwa Daniel Dar i współpracowników [4].



Rysunek 18. Analiza biblioteki cDNA dla hodowli kontrolnej z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.



Rysunek 19. Analiza biblioteki cDNA dla hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.

5.3 Analiza danych wysokoprzepustowych – Identyfikacja kandydatów na ryboprzełączniki.

Mając do dyspozycji zmapowane do genomu referencyjnego odczyty z sekwencjonowania metodą Term-seq przeanalizowałam uzyskany w ten sposób obraz transkryptomu z hodowli kontrolnej, a także hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l przy pomocy programu Integrative Genomics Viewer (IGV). IGV jest zaawansowana aplikacją służącą do przeglądania danych z sekwencjonowania w celu przeprowadzania złożonej analizy wariantów [121]. Wstępna selekcja potencjalnych ryboprzełączników polegała na analizie porównawczej obu warunków z zachowaniem określonych wytycznych. Pierwszą cechą wyróżniającą ryboprzełączniki spośród innych ncRNA jest lokalizacja. Zwiększona liczba skróconych odczytów dla hodowli z antybiotykiem mapujących do regionu 5' UTR wskazywała na obecność potencjalnego kandydata na ryboprzełącznik, gdyż to właśnie w tej lokalizacji znajduje się większość ryboprzełączników. Istotną również była długość samego regionu 5' UTR, który w przypadku bakterii jeśli zawiera ryboprzełącznik posiada średnio do 330 nt. Długość nie była jednak parametrem dyskryminującym, gdyż jest to cecha statystyczna, nie reguła [122]. Natomiast kluczowe w typowaniu potencjalnych kandydatów na ryboprzełączniki było określenie struktury drugorzędowej przy użyciu RNAstructure, programu przeprowadzającego symulację fałdowania i hybrydyzację w obrębie jednoniciowej sekwencji kwasu nukleinowego. Predykcja ta jest niezbędna do określenia bardzo istotnego wyróżnika – obecności struktury spinki terminacyjnej. Jej pozycja - odległość względem aptameru - może sugerować rodzaj kontroli genu po związaniu ligandu [123, 124]. Domena aptameru znajdująca się powyżej może przybierać strukturę pseudowęzła lub składać się z od dwóch do sześciu struktur typu spinka. O klasyfikacji kandydatów decydowała również ilość wygenerowanych struktur alternatywnych. Sekwencje potencjalnych ryboprzełączników nie powinny tworzyć więcej niż dwa układy, ze względu na warunek mówiący o jednoznaczności sygnałów będących wynikiem regulacji określonym ligandem. Każdy spośród wyselekcjonowanych kandydatów spełnia także kryterium mówiące o współwystępowaniu danego motywu RNA u innych gatunków, kryterium występowania ortologów. Aspekt strukturalny, który także miał wagę przy ocenie to obecność ciągu nukleotydów uracylu na końcu 3' wygenerowanego motywu.

Chociaż zidentyfikowane elementy regulatorowe zlokalizowane zostały zarówno w obrębie sekwencji genów kodujących jak i hipotetycznych białek, do dalszych analiz wybrane zostały tylko te o potwierdzonej funkcji. Intencją tej selekcji jest wskazanie, które elementy komórkowe mogą podlegać regulacji w odpowiedzi na stres antybiotykowy. W Tabeli 9 zamieszczone zostały wyselekcjonowane geny, w których w regionie 5'UTR zidentyfikowałam potencjalne ryboprzełączniki. Referencją dla przeprowadzonej analizy jest sekwencja dostępna w bazie danych NCBI o sygnaturze NC_007795.1 (NCBI reference Sequence: NC_007795.1). Na potrzebę niniejszej pracy każdemu kandydatowi na ryboprzełącznik została nadana nazwa robocza, będąca skrótem literowym od angielskiej nazwy produktu genu.

Początkowo oczekiwania związane z wyborem kandydatów na ryboprzełączniki nastawione były na znalezienie elementów regulatorowych w obrębie genów bezpośrednio związanych z syntezą ściany komórkowej. Jednakże analiza wyników sekwencjonowania Term-seq wykroczyła znacznie ponadto, wskazując na geny, które pozornie mogłyby zostać przeoczone. Profil zmian, który wyłonił się po zakończeniu identyfikacji koreluje z najnowszymi doniesieniami wskazującymi na trajektorię regulacji komórkowej u *Staphylococcus aureus* będącą odpowiedzią na wankomycynę. Obserwowana przez Fait i współpracowników adaptacja prowadzonych równolegle hodowli różnych szczepów *Staphylococcus aureus* zachodziła w sposób zróżnicowany, pomimo końcowego osiągnięcia przez wszystkie fenotypu VISA. Pogrupowanie różnic według klastrow grup ortologicznych poskutkowało obserwacją, że największa liczba zmian zachodzi w obszarze genów związanych z procesami komórkowymi, sygnalizacją oraz metabolizmem [125]. W niniejszej pracy, spośród siedmiu kandydatów, aż cztery znajdują się w 5'UTR mRNA genów bezpośrednio związanych są z metabolizmem (Ryboprzełącznik MST, Ryboprzełącznik MCAS, Ryboprzełącznik HSK, Ryboprzełącznik ASC), dwa z przetwarzaniem informacji genetycznej (Ryboprzełącznik PABCT, Ryboprzełącznik DT) oraz jeden kandydat, którego metafunkcja nie została jeszcze sprecyzowana (Ryboprzełącznik BA). Jednakże, jak wynika z dotychczasowych ustaleń gen znajdujący się pod kontrolą zidentyfikowanego Ryboprzełącznika BA, jest ściśle powiązany z metabolizmem ściany komórkowej.

Jak dalej opisuje Fait i współpracownicy mutacje dotknęły również geny związane z biosyntezą peptydoglikanu oraz kwasów teichojowych, jednakże nie były one pierwszoplanowe. Pośrednio z tym aspektem było zidentyfikowanie w badaniu mutacji wokół węzła pirogronianowego, co prawdopodobnie prowadziło do zwiększonego

przepływu węgla służącego jako prekursor ściany komórkowej. Badanie to wskazuje na bardzo istotny aspekt ujawnia się oporności na wankomycynę u MRSA, iż pomimo wspólnego tła genetycznego, poszczególne linie MRSA mogą przystosować się poprzez różnorodne mechanizmy [125].

Poniżej w podrozdziałach scharakteryzowane zostały produkty transkrypcji genów dla których zidentyfikowano potencjalne ryboprzełączniki w ujęciu antybiotykooporności oraz antybiotykoterapii.

cecha identyfikacyjna produkt genu znajdującego się poniżej kandydata	pan gen Symbol genu poniżej	Lokaliza cja ryboprze łącznika oraz nieć	Współrzed ne genowe	ID SYMBOL	Nazwa robocza	Metafunkcj a	Szczegółow a klasa funkcjonaln a genu wg. TIGRFam
Transporter ABC, białko wiążące ATP	-	181906- 181967 (+)	180402 .. 181994	SAOUHSC_ 00167	Ryboprzełącznik PABCT	Przetwarzanie informacji genetycznej	Metabolizm DNA
Cukrowy transporter ABC, białko wiążące ATP	<i>malK</i>	191445- 191559 (-)	191491..1925 88	SAOUHSC_ 00175	Ryboprzełącznik MST	Metabolizm	Białko transportujące i wiążące
Podjednostka D kompleksu antyporterowego	<i>mnhF</i>	850676 – 850742 (+)	849301 .. 850797	SAOUHSC_ 00886	Ryboprzełącznik MCAS	Metabolizm	Białko transportujące i wiążące
Kinaza homoseryny	<i>thrB</i>	1265767- 1265834 (-)	1265768.. 1266682	SAOUHSC_ 01322	Ryboprzełącznik HSK	Metabolizm	Biosynteza aminokwasów
Komponent pierwszy syntazy kwasu antranilowego	<i>trpE</i>	1310359 – 1310420 (-)	1310437..131 1843	SAOUHSC_ 01366	Ryboprzełącznik ASC	Metabolizm	Biosynteza aminokwasów
Dwufunkcyjna autolizyna	-	1930072 – 1930141 (+)	1928152..193 0050	SAOUHSC_ 02023	Ryboprzełącznik BA	Funkcja nieznana	Domniemane białko
Transferaza dimetyloadenozy nowa	<i>ksgA</i>	465190 – 465290 (-)	2739870..274 0781	SAOUHSC_ 00464	Ryboprzełącznik DT	Przetwarzanie informacji genetycznej	Synteza białek

Tabela 9. Zestawienie informacji o zidentyfikowanych kandydatach na ryboprzełączniki w regionie 5'UTR siedmiu wybranych genów.

Nazwa ryboprzelącznika	nt	Sekwencja potencjalnego ryboprzelącznika (5' – 3')
Ryboprzelącznik PABCT	63	CTGAATGTACAATTCAATTATGATGAAACTACAGTTCAAGCGGTAAAAACG TCTCTTTCGA
Ryboprzelącznik MST	116	AGTGTATTGCACAATCAAACGTGTAACAAAGTATGGGAGGCATAACATGGC AGAACTAAAGTTAGAGCATATTAAGACGTATGATAACAACAATACTGT AGTGAAAGATTTT
Ryboprzelącznik MCAS	68	TATTACTTGTCTTTATTGGAAAGCGTCCTATTATAAAGCGTTATGTCGCACTA GGCGGTACATTATT
Ryboprzelącznik HSK	69	CATGTCGAATGTTTTGGAGTTAACAATTCCTGCATCAACAGCCAACCTTGGGA GTTGGCTTTGATTCTA
Ryboprzelącznik ASC	63	TTAATTTAGGTGGTACCACGCGTCAGCGTCCTTTATATTGATAAGGATGCTGG CGCTTTTTT
Ryboprzelącznik BA	71	GGGCGTGCTTCTGGTTTTGGTAAATGTAAATAACAGTTAAGAGTCAGTGCTTC GGCACTGGCTTTTTATT
Ryboprzelącznik DT	102	ATGAATGAGGAAGTGAAAATGTTGGATAATAAAGATATTGCAACACCATCA AGAACGCGAGCGTTGTTAGATAAATATGGCTTTAATTTAAAAAAGTTT

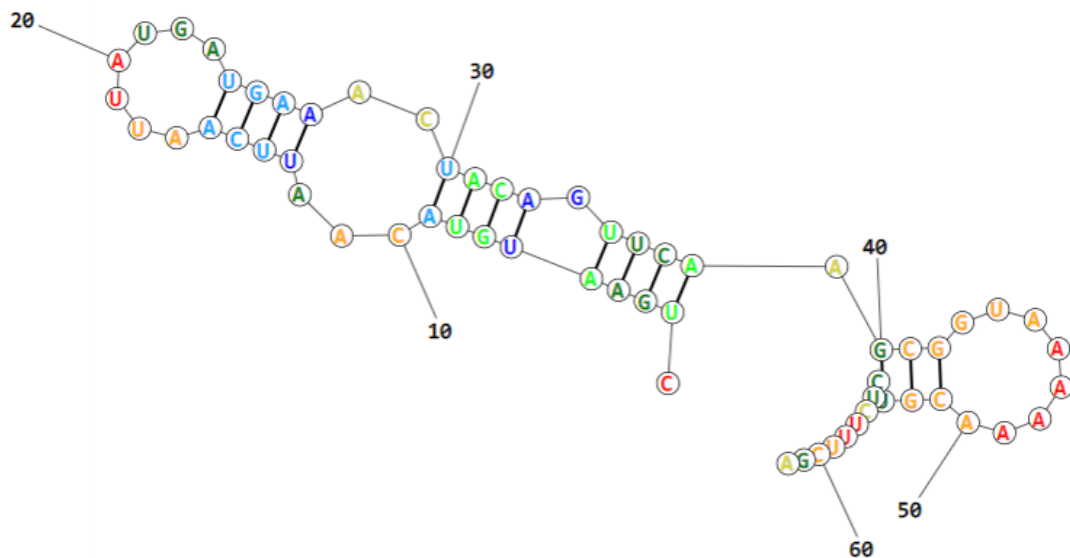
Tabela 10. Sekwencja zidentyfikowanego regionu dla kandydatów na ryboprzelączniki wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure.

5.3.1 Ryboprzelącznik PABCT

Jako pierwszy na potencjalny ryboprzelącznik zidentyfikowany został odczyt w regionie 5' UTR genu kodującego transporter ABC, białko wiążące ATP (ang. *Peptide ABC transporter, ATP – binding protein*) (Rysunek 20). W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego zlokalizowany został kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 21.



Rysunek 20. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika PABCT. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.

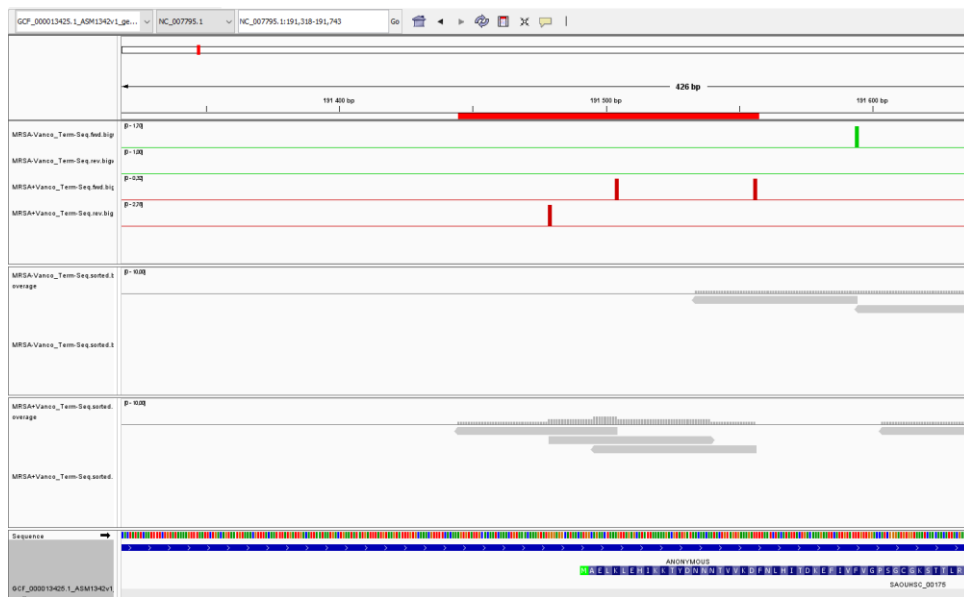


Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

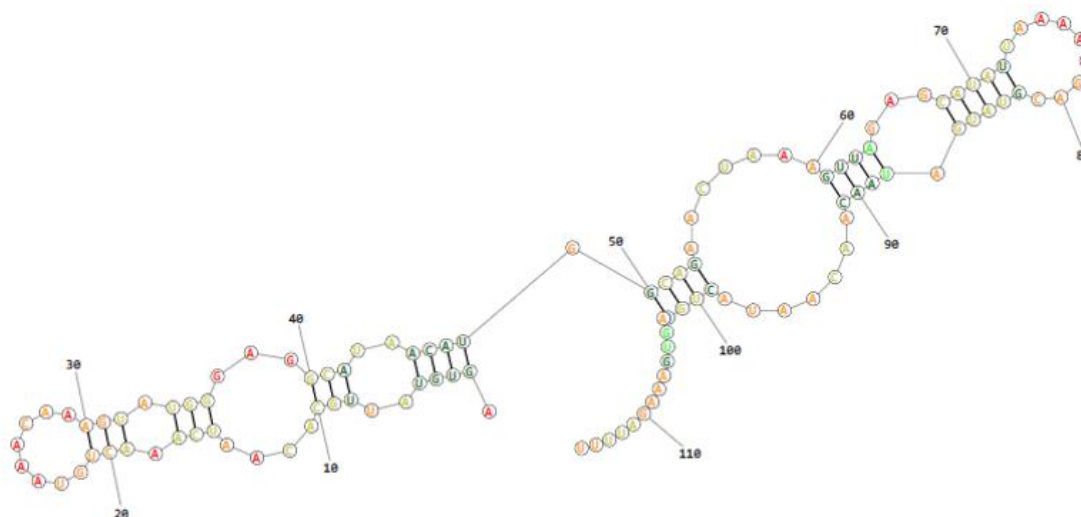
Rysunek 21. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik PABCT znajdującego się w regionie 5' genu kodującego Transporter ABC, białko wiążące ATP. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.

5.3.2 Ryboprzełącznik MST

Zakwalifikowanym kandydatem na ryboprzełącznik został odczyt sekwencji znajdujący się w regionie 5'UTR genu kodującego białko wiążące ATP, które pośredniczy w transporcie cukrów (ang. *Multiple sugar-binding transport ATP-binding protein*) (Rysunek 22). W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego znajduje się kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 23.



Rysunek 22. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika MST. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

Rysunek 23. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzelącznik MST znajdującego się w regionie 5' genu kodującego cukrowy transporter ABC, białko wiążące ATP. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej

Dyskusja do 5.3.1 i 5.3.2

Transportery ABC (ang. *ATP-binding cassette*) jako spotykane we wszystkich formach życia, pełnią jedną z podstawowych funkcji w komórce. Zapewniają jednokierunkowy ruch przez błony z udziałem ATP szerokiej gamie substratów od jonów metali aż po białka. Posiadają zarówno funkcję eksporterów jak i importerów komórkowych. Badania genomyczne wykazały, że transportery ABC stanowią jedną z najważniejszych rodzin białek u prokariotów kodując około 5% genomów u *E. coli* i *Bacillus subtilis* [126]. Molekuły te jako związane z patogenezą bezpośrednio uczestniczą w: oporności wielolekowej, adhezji, tworzeniu przetrwalników, koniugacji, tworzeniu biofilmu oraz wydzielaniu toksyn. Są niezbędnym elementem wirulencji u wielu bakterii w tym *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus pneumoniae* [127].

Obecność tych białek w komórce ma również swój szczególny profil w kontekście transportu ksenobiotyków oraz stresu nimi wywołanych. Występuje zauważalna korelacja, zwłaszcza wśród bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, lokowania genów kodujących białka transporterowe w sąsiedztwie systemów regulatorowych związanych z adaptacją do stresu antybiotykowego [128, 129, 130]. Zależność ta ma silne

ewolucyjnie podłoże związane z ochroną przed bakteriocynami zarówno tymi, produkowanymi przez same drobnoustroje, jak i pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego. W przypadku *S. aureus*, w aż 4 miejscach na chromosomie geny kodujące Transportery ABC znajdują się w sąsiedztwie dwukomponentowego systemu TCRS (ang. *two-component regulatory systems*) [131], nadekspresja którego związana jest z ujawnianiem fenotypu VISA [132]. System ten znany również pod nazwą *graRS* odpowiedzialny jest za sygnalizację komórkową i aktywację procesów opornościowych poprzez regulację transkryptów krytycznych dla przetrwania bakterii.

Aktywacja oporności wielolekowej u *S. aureus* przypisana została zarówno do importerów jak i eksporterów ABC. Jak wynika z badań nad MRSA, nadekspresja eksportera ABC TarH powoduje indukcję ropni skóry w modelach mysich z powodu zwiększonej ilości kwasu teichojowego obecnego w ścianie komórkowej MRSA. Ponadto, dostrzeżono pozytywną korelację pomiędzy nadekspresją kwasu teichojowego a ekspresją transportera TarG/H zależnego od systemu Agr scharakteryzowanego jako globalny regulator wirulencji u *S. aureus* [133]. Zgodnie z doniesieniami Ynfu Lu i współpracowników, zaburzenia biosyntezy kwasu teichojowego w ścianie komórkowej przyczyniają się do aktywacji systemu mającego związek z opornością na glikopeptydy w tym wankomycynę VraRS [134].

Odnosząc się do tego można stwierdzić, że zmiany w ekspresji genów kodujących Transportery ABC są objawem ujawniania się procesów antybiotykoopornościowych. Ponadto, poniżej genu kodującego Transporter ABC, białko wiążące ATP w obrębie tego samego operonu znajduje się gen SAOUHSC_00169. Jest to transporter peptydowy ABC, białko permeazy (ang. *peptide ABC transporter, permease protein*) wymieniany jako jeden z siedmiu genów odgrywających kluczową rolę w regulowaniu plastyczności fenotypowej pod wpływem wankomycyny [135]. Zidentyfikowany w mojej pracy doktorskiej kandydat na ryboprzełącznik może być zatem regulatorem całego operonu.

Nieoczywistą funkcją opisaną w literaturze dotyczącą genu *malK*, w obrębie którego zidentyfikowałam ryboprzełącznik jest fakt, że systemy ABC zdolne są do bezpośredniej regulacji procesów fizjologicznych. Jednym z udokumentowanych przypadków transportera ABC, u którego zidentyfikowano domenę zaangażowaną w funkcje regulatorowe jest białko MalK. Dostępność struktury o wysokiej rozdzielczości tego białka umożliwiła wskazanie mechanizmu innego niż reakcja transportowa. Wariacja na tym podstawowym schemacie łączy hydrolizę ATP z procesami niewymagającymi transportu, takimi jak naprawa DNA i regulacja ekspresji

genów. W tym kontekście niezbędne jest odróżnienie bezpośredniej roli regulatorowej białka MalK od pośredniej mającej związek z transportem maltozy i maltodekstryny w komórce [136]. Ostatnie dane wskazują, że podjednostka transportera MalK odpowiedzialna za wiązanie ATP bezpośrednio uczestniczy w kontroli transkrypcji regulonu mal. Pomimo tej wiedzy, wciąż istnieją podstawowe kwestie wymagające wyjaśnienia dotyczące mechanizmu aktywacji MalT, represji przez transporter, biosyntezy i składania białek transportujących w błonie zewnętrznej i wewnętrznej oraz wzajemnych zależności między enzymami maltodekstrozy, a metabolizmem glukozy i glikogenu [137]. Istotne z punktu widzenia oporności na wankomycynę i Transporterów ABC pośredniczących w transporcie cukrów wydają się być zmiany związane są z wcześniejszymi etapami biosyntezy ściany komórkowej.

Analiza sekwencji genomu i porównanie 362 otwartych ramek odczytu pomiędzy szczepami MRSA Mu50 a wzorcowym, wrażliwym na wankomycynę N315, wykazała aż 213 różnic na poziomie DNA. Spośród nich 174 geny (stanowiące 6,6% ze wszystkich 2699 genów szczepu Mu50) ulegały zmianie sensu na poziomie produktu genu. Zauważalny trend pojawił się na trzech obszarach genetycznych. Pierwszy z nich obejmował geny odpowiedzialne za transport komórkowy (14,9% ze 174 istotnie różniących się), następnie geny związane z metabolizmem węglowodanów (5,7%) oraz geny uczestniczące w syntezie RNA oraz mechanizmach regulacyjnych (8,0%) [11, 13]. Wyniki te wydają się potwierdzać i wyjaśniać pewne wcześniejsze hipotezy, związane z rolą węglowodanów jako źródeł węgla w procesach biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii. Związki te w trakcie procesów transportu komórkowego, mogą ulegać fosforylacji za pośrednictwem systemu fosfotransferaz PTS co prowadzi do ich włączenia w cykl przemian metabolicznych [19, 14]. Wykazana w niniejszej pracy aktywność ryboprzełącznika w obrębie genu kodującego białko wiążące ATP, które pośredniczy w transporcie cukrów może być podstawą do dalszych badań mających na celu określenie udziału tego transportera w procesach ujawniania się antybiotykooporności.

Zrozumienie struktury i funkcji transporterów ABC oraz ich roli w wirulencji i patogenezie bakterii doprowadziło do odmiennego spojrzenia na terapie przeciwdrobnoustrojowe. Wraz ze wzrostem badań nad transporterami ABC jako determinantami zjadliwości u bakterii chorobotwórczych wzrasta liczba badań nad odwróceniem ich ról jako nowych środków terapeutycznych. Spośród obiecujących, choć nielicznych badań klinicznych wykorzystujących transportery ABC jako

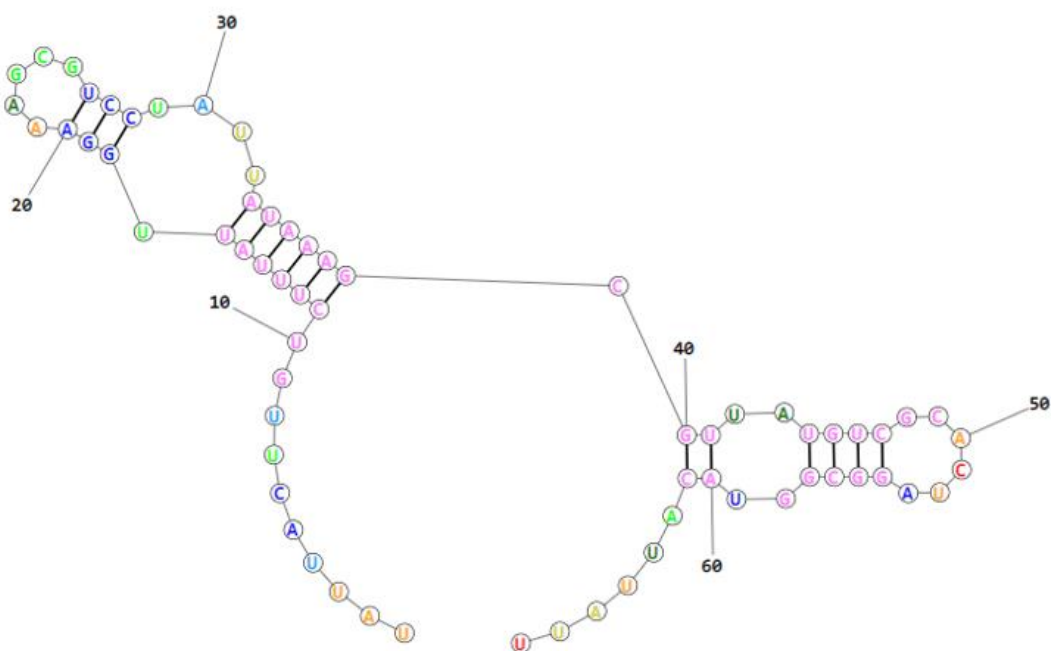
szczepionki wynika, że obszar ten jest mocno niedoceniony pod względem potencjału terapeutycznego. Badania eksperymentalne na myszach pokazują, że bakteryjne transportery ABC mogą potencjalnie odwrócić oporność poprzez naśladowanie substratów - mimetyków [138] w celu zwiększenia przepuszczalności antybiotyków oraz poprzez zastosowanie inhibitorów ABC dla zmniejszenia wydalania ksenobiotyków [139]. Powstają również badania wskazujące na możliwość selektywnej modulacji wybranych transporterów ABC umożliwiając projektowanie nowych wysoce ukierunkowanych środków terapeutycznych [140]. I chociaż wyniki badań tego typu na modelu *in vivo* wyglądają bardzo obiecująco, to przełożenia na badania kliniczne brak. Rozczarowanie to wynika z niedoszacowania złożoności występowania oporności wielolekowej oraz konieczności zastosowania toksycznych dawek leku w celu uzyskania skutecznych wyników. Zauważalny trend wśród badaczy związany jest z odejściem od inhibitorów oraz mimetyków ABC na rzecz wdrażania potencjalnych terapii genowych, w których pośredniczą transportery ABC. Opracowywana obecnie strategia wykorzystująca technologię CRISPR/Cas9 służy do odwracania nowo nabytej oporności u Mącznicy różowej (*Pectinophora gossypiella*) na bakteryjną toksynę Cry2Ab, w której kluczową rolę odgrywa transporter ABC [141]. I chociaż nie prowadzono tego typu badań na bakteriach chorobotwórczych pogłębia to wiedzę na temat potencjalnych strategii nacelowanych na transportery ABC w kontekście terapii genowych do grona których zaliczyć można wykorzystanie ryboprzełączników.

5.3.3 Ryboprzełącznik MCAS

Kolejnym zidentyfikowanym kandydatem na ryboprzełącznik jest odczyt obecny w regionie 5'UTR genu kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego (ang. *Monovalent cation/H antiporter subunit D*) (Rysunek 24), zaangażowanego w odporność na wysokie stężenia Na, K, Li oraz środowisko zasadowe. Podjednostka ta zawiera domenę oksydoreduktazy, która katalizuje przeniesienie elektronów z NADH na ubiquinon. W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego zlokalizowany został kandydat. Sekwencja odczytu z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 25.



Rysunek 24. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika MCAS. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

Rysunek 25. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik MCAS znajdującego się w regionie 5' genu kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej

Dyskusja do 5.3.3

Antyportery są strukturami zlokalizowanymi w błonie komórkowej bakterii, które umożliwiają transport aktywny cząsteczki wbrew gradientowi elektrochemicznemu sprzężonego z transportem innej cząsteczki zgodnie z gradientem. Cechą charakterystyczną tej formy przemieszczania się substancji chemicznych jest przyjmowanie jednej substancji (jonu, metabolitu) do wnętrza z równoczesnym usuwaniem innej. Poszczególne podjednostki (ABCDEFG) składające się na białko antyporterowe kodowane są w klastrze zwanym *mrp* (ang. *multiple resistance and pH*). Oprócz utrzymywania cytoplazmatycznego pH, kompleks Mrp pełni różne inne funkcje, takie jak oporność na kwasy żółciowe u *Bacillus subtilis* i *Vibrio cholera* [142, 143], uczestniczy w procesie sporulacji u *Bacillus subtilis* [144], infekcji roślin u *Sinorhizobium meliloti*, a nawet w patogenie u *Pseudomonas aeruginosa* [145].

S. aureus jest nie tylko powszechny w warunkach szpitalnych, ale także skutecznie przeżywa w nieprzyjaznym środowisku wysokiego zasolenia (25%) oraz niskiej aktywności wody, zachowując zdolność do wzrostu i produkcji enterotoksyn. Bakterie te są zdolne do wzrostu w środowiskach silnie zasadowych (pH do 9,5) panujących w glebie, ściekach i niektórych częściach ludzkiego jelita. [146]. *Staphylococcus aureus* wykazuje niezwykłą zdolność do wzrostu pod wpływem stresu osmotycznego i własność ta leży u podstaw do wzrostu w szerokiej gamie stresu środowiskowego. Tak wysoka tolerancja na fluktuacje ciśnienia osmotycznego i warunków środowiskowych jest w dużej mierze spowodowana aktywnością antyporterów. Szczególnym przykładem jest TetA(K), który działa jak antyporter metal-tetracyklina i uczestniczy w stresie środowiskowym wywołanym obecnością antybiotyku. Białka TetA są facylitatorami, które wykorzystują energię protonu jako siłę napędową funkcji transportowej do usuwania antybiotyku poza komórkę [147].

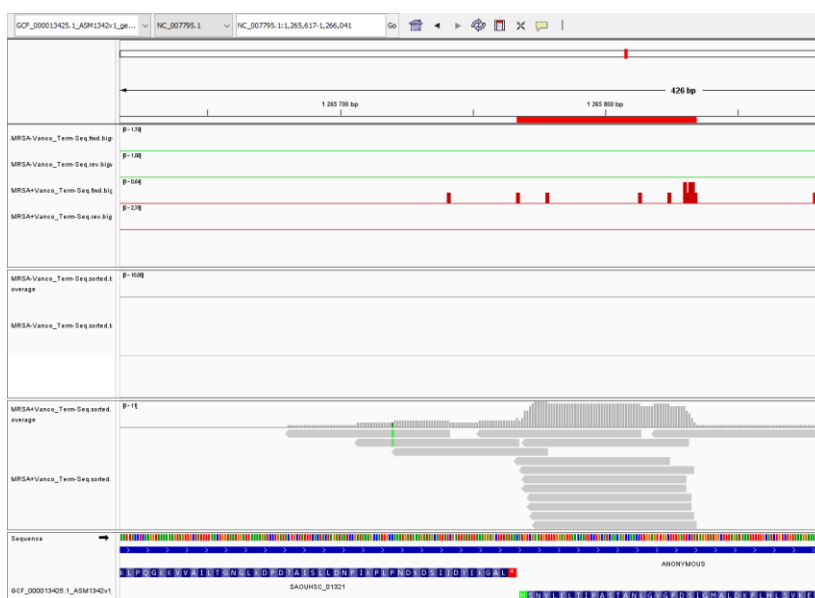
Zidentyfikowany w mojej pracy doktorskiej Ryboprzełącznik MCAS znajduje się w obrębie genu *mnhF* (homologiczny do transporterów soli żółciowej u ssaków), którego funkcja powiązana została bezpośrednio z opornością na sole żółciowe, które to stanowią poważne wyzwanie dla bakterii przeżywających przejście przez żołądek do jelit. Sole kwasów żółciowych posiadają działanie przeciwdrobnoustrojowe, co przypisuje się ich zdolności do uszkodzania błon komórkowych [148]. Wankomycyna jako antybiotyk zaburza syntezę ściany komórkowej, zatem zmiana ekspresji genu *mnhF* może być efektem stresu w obrębie tej struktury.

Podczas gdy kolonizacja nosa jest dobrze znanym czynnikiem ryzyka dla większości typów infekcji *S. aureus*, kilka ostatnich badań sugeruje, że kolonizacja jelita, która występuje u około 20% osób, może mieć ważne implikacje kliniczne [149]. Badania prowadzone wśród pacjentów przebywających na szpitalnych oddziałach intensywnej terapii oraz u osób po przeszczepach wykazały, że pacjenci z kolonizacją odbytnicy, jak i nozdrzy przez metycylinooporny szczep *S. aureus* mieli znacznie wyższe ryzyko niepowodzenia terapii antybiotykowej (40%) niż pacjenci z kolonizacją samego nosa (18%) [150]. Ponadto, badanie pacjentów hospitalizowanych w Stanach Zjednoczonych wykazało kokolonizację przez *S.aureus* i enterokoki odporne na wankomycynę u 50% badanych osób [151]. Jest zatem prawdopodobne, że kolonizacja jelit przez *S.aureus* stwarza patogenowi potencjalną okazję do nabywania nowych genów oporności na antybiotyki, lub wzmacnia procesy adaptacyjne w obrębie ściany komórkowej.

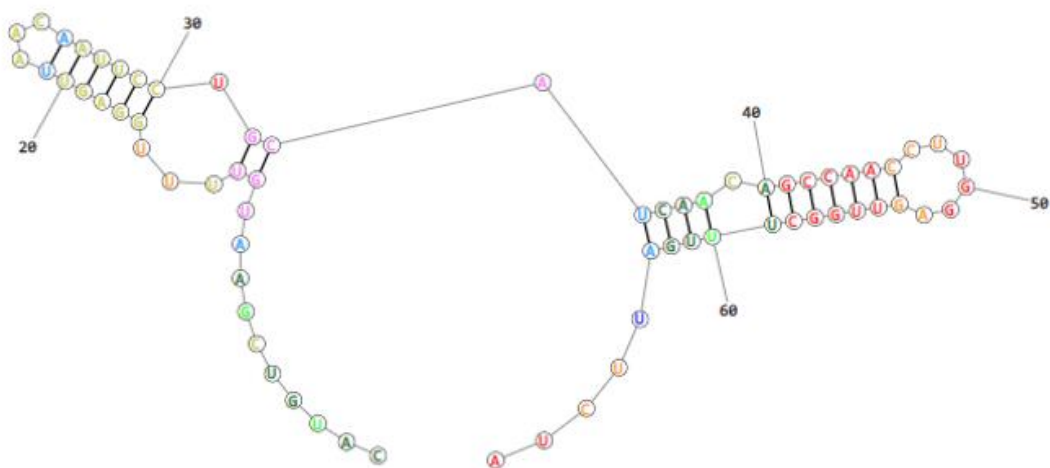
Zgodnie z zaproponowanym przez Laurę Marks i współpracowników modelem badawczym antyportery są strukturami, których wykorzystanie może zakończyć się udaną antybiotykoterapią w przypadku lekoopornych szczepów gronkowca złocistego. W tym celu została wykorzystana ludzka alfa-laktoalbumina, która wykazuje działanie zarówno przeciwnowotworowe jak i bakteriobójcze. Wykorzystana została jako adiuwant przeciwdrobnoustrojowy, który zwiększa aktywność szerokiego spektrum antybiotyków (metycylina, wankomycyna, gentamycyna, erytromycyna) przeciwko wielolekoopornemu *Staphylococcus aureus* do stopnia, w którym staje się ponownie wrażliwy. Specyficzność albuminy polega na rozpraszaniu gradientu protonów i indukowaniu zależnego od sodu napływu wapnia, który częściowo depolaryzuje błonę cytoplazmatyczną co w efekcie skutkuje zwiększonym wiązaniem wankomycyny, gentamycyny lub penicyliny [152]. Jest to jak dotąd najbardziej efektywne wykorzystanie antyporterów jako pośredniego celu w udoskonaleniu terapii przeciw antybiotykoopornym szczepom gronkowca złocistego.

5.3.4 Ryboprzełącznik HSK

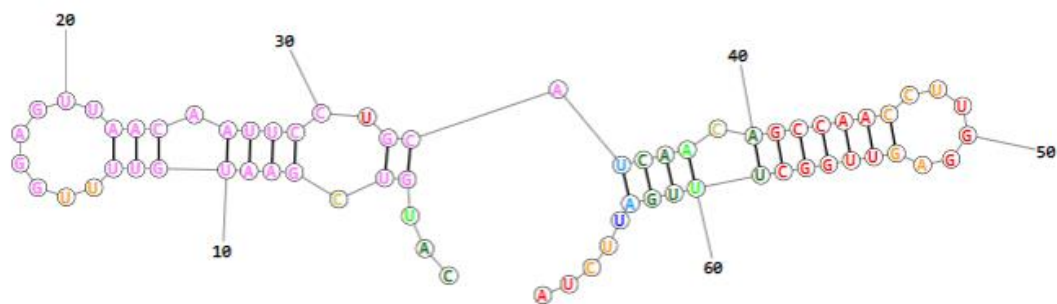
Sekwencja spełniająca kryteria na ryboprzełącznik została również zlokalizowana w regionie 5' UTR genu *thrB*, której produktem jest kinaza homoseryny (ang. *Homoserine kinase*) (Rysunek 26). W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego znajduje się kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 27. Kinaza ta katalizuje tworzenie O-fosfo-L-homoseryny w biosyntezie treoniny z asparaginianu.



Rysunek 26. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika HSK. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



lub



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

Rysunek 27. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzelącznik HSK znajdującego się w regionie 5' genu kodującego kinazę homoseryny. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonych strukturach drugorzędowych.

Dyskusja do 5.3.4

Konfrontacja mojej obserwacji eksperymentalnej z dostępną literaturą przedmiotu wskazuje na doniesienie z 1994 roku, gdzie *thrB* zlokalizowany jest jako gen sąsiadujący przy *femC* (ang. *factors essentials for methicillin resistance*), określanym jako region zawierający czynniki wpływające na ujawnianie się oporności na metycylinę poprzez zmianę syntezy peptydoglikanu i glutaminy. Zgodnie z wynikami Gustafsona i współpracowników, inaktywacja *femC* poprzez insercję transpozonu zmniejsza podstawowy poziom oporności [153]. *thrB* to gen kodujący enzym odpowiadający za

biosyntezę treoniny z asparagianinu poprzez tworzenie O-fosfo-L-homoseryny. W 2010 Liebeke i współpracownicy ujawnili, że wykrycie kilku różnic w metabolizmie nukleotydów, a zwłaszcza metabolitów będących prekursorami ściany komórkowej, wskazuje na nieopisane wcześniej znaczenie kinazy treoninowej w regulacji metabolizmu ściany komórkowej gronkowców w kontekście antybiotykooporności [154]. Kolejne doniesienia pochodzące od Fridmana i współpracowników ujawniły bezpośredni związek tego enzymu z antybiotykoopornością w metycylinoopornym szczepie gronkowca złocistego. Autorzy wskazali na powiązanie dwóch odrębnych ścieżek sygnałowych dotyczących działania kinazy treoniny/seryny STK (ang. *serine-threonine kinase*) oraz dwuskładnikowego systemu GraSR związanego z odpowiedzią na peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz wankomycynę. Oba układy zaangażowane są w wirulencję i wykazywanie oporności wobec związków inhibujących syntezę ściany komórkowej. Z badań wynika, że białko regulujące odpowiedź GraR ulega fosforylacji przez kinazę treoniny/seryny na trzech resztach treoniny w domenie wiążącej DNA. GraR bierze udział w regulacji operonu *dltABCD*, którego produkty dodają D-Ala do kwasu teichojowego. Analiza NMR kwasów teichojowych pochodzących z mutantu pozbawionego miejsc fosforylacji kinazą wykazała wyraźny negatywny wpływ tej delecji na zawartość D-Ala. Odkrycia te dostarczają dowodów, że komponent regulatorowy związany opornością na wankomycynę (GraR) jest celem kinazy treoniny/seryny [155]. Co więcej, modyfikacje potranslacyjne białek, a w szczególności fosforylacja, radykalnie zwiększają złożoność sieci regulatorowej w komórce. Przykładem tego zjawiska jest fosforylacja zachodząca na reszcie cysteiny w rodzinie białek A (SarA)/MarR globalnego regulatora transkrypcji A (MgrA), i jest wynikiem działania kinazy treoniny/seryny w *Staphylococcus aureus*. Zachodząca Cys-fosforylacja ma kluczowe znaczenie w regulacji determinantów wirulencji oraz wykazywaniu oporności na wankomycynę [156]. Badania transkryptomu pokazują, że kinaza treoniny/seryny ma silny wpływ na regulację biosyntezy puryn, metabolizm ściany komórkowej, a także autolizę [157]. Delecje kinazy treony/seryny wprowadzają poważne defekty w podziale komórek i morfologii ściany komórkowej oraz powodują wzrost wrażliwości na antybiotyki β -laktamowe i glikopeptydy. Powiązanie fosforylacji przez kinazę treoniny/seryny w kontekście uzyskiwania antybiotykooporności jest obecnie bardzo szeroko opisywanym zjawiskiem. Znaczenie kinazy określane jest jako krytyczny element regulujący procesy związane z tworzeniem się septum podziałowego, regularnym kształtem i grubością ściany komórkowej [158].

Kinaza białkowa seryny/treoniny nie jest niezbędnym białkiem dla przetrwania MRSA, jednakże może stanowić istotny czynnik terapeutyczny w terapii skojarzonej. Kant i współpracownicy przedstawili działanie cząsteczki quinazolinowej; Inh2-B1, której działanie polega na specyficznym hamowaniu kinazy poprzez łączenie się z domeną katalityczną wiążącą ATP. Analizy funkcjonalne na myszach zakażonych MRSA wykazały, że już przy stężeniu mikromolowym ceftriaksonu lub cefotaksymu podanego w obecności Inh-B1 wzrost MRSA został zahamowany, czego nie obserwowano przy podaniu samego antybiotyku lub samej cząsteczki quinazolinowej. Związek Inh-B1 został nazwany „łamaczem oporności na antybiotyki”. Przykład ten wskazuje, że kinaza treoniny może być bardzo obiecującym celem w opracowywaniu alternatywnych metod walki z antybiotykoopornością w MRSA [159].

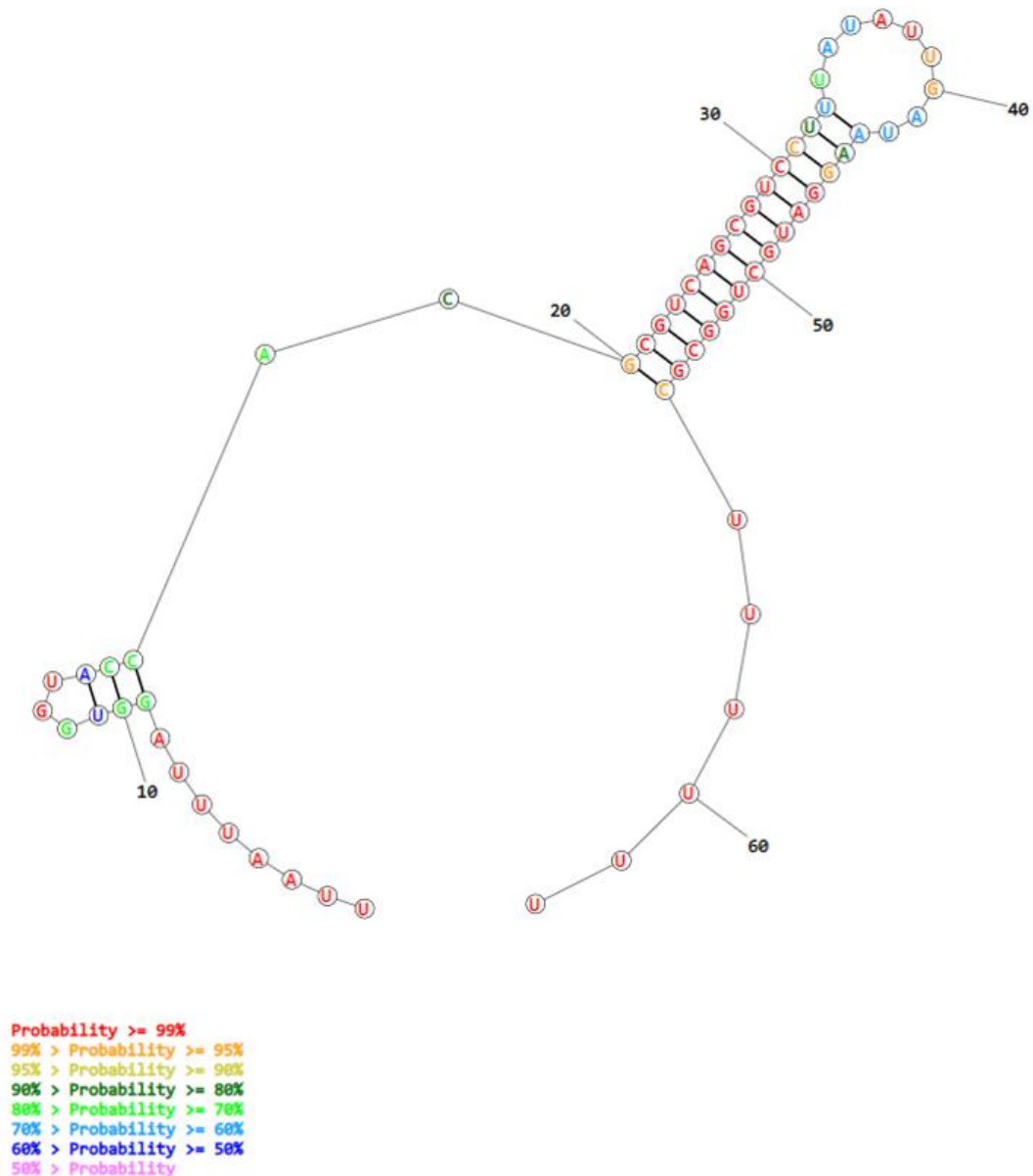
Kolejną propozycją walki z opornością na antybiotyki jest zastosowanie pyrazolopirydazyny GW779439X, która uwrażliwia metycylinooporny szczep gronkowca złocistego na β -laktamy poprzez hamowanie kinazy STK1 [160]. Przedstawione w literaturze przedmiotu konkretne związki wyciszające kinazę treoniny/seryny odnoszą się głównie do powstrzymywania oporności na β -laktamy. Pomimo udokumentowanego związku pomiędzy ujawnianiem się oporności na wankomycynę; a kluczowym znaczeniem w tym procesie aktywności kinazy treoniny/seryny nie wskazano dotychczas na adjuwanta zwiększającego skuteczność tego glikopeptydu. Zidentyfikowany przeze mnie kandydat na Ryboprzełącznik HSK może być obiecującym i nowatorskim celem w opracowywaniu metody hamowania procesów komórkowych związanych z ujawnianiem się fenotypu VISA.

5.3.5 Ryboprzełącznik ASC

W regionie 5'UTR genu *trpE* kodującego komponent pierwszy syntazy kwasu antranilowego (ang. *Anthranilate Synthase Component I*) zlokalizowana została sekwencja spełniająca wszystkie kryteria kandydata na ryboprzełącznik (Rysunek 28). Wraz z komponentem II, amidotransferazą glutaminy katalizuje tworzenie antranilanu z choryzmatu i glutaminy. W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego znajduje się kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 29.



Rysunek 28. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika ASC. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



Rysunek 29. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzelącznik ASC znajdującego się w regionie 5' genu kodującego komponent I syntazy kwasu antranilowego. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.

Dyskusja do 5.3.5

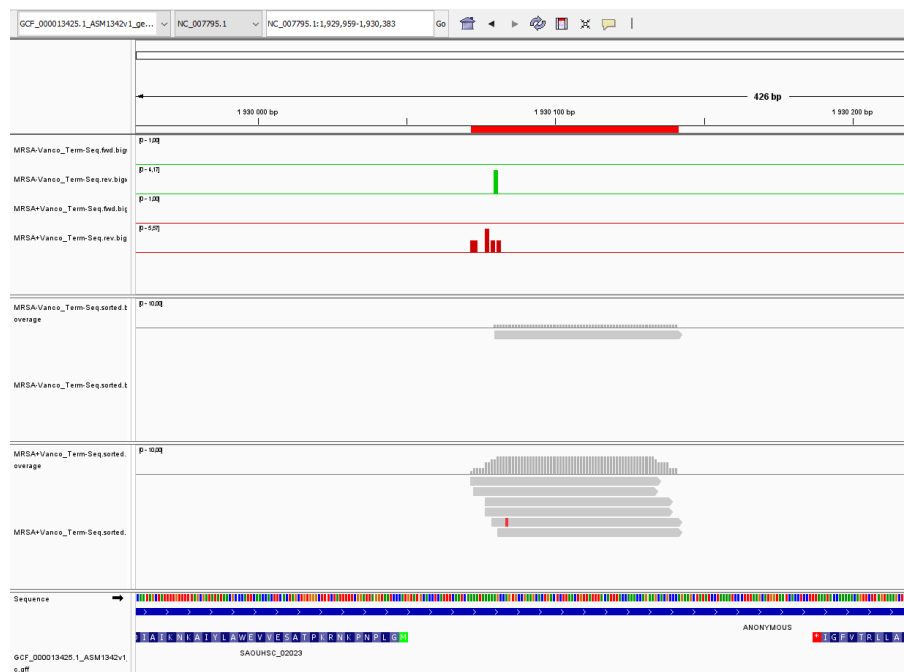
Produktem *trpE* jest syntaza antranilanowa, która jako część kompleksu heterotetramerycznego katalizuje dwuetapową biosyntezę antranilanu, związku pośredniego w biosyntezie L-tryptofanu [161]. W 2022 roku pojawiło się badanie, w którym Hyeon-Ji Hwang wraz z współpracownikami wskazał na dodatkowe funkcje produktu działania syntazy. Antranilan zidentyfikowany został jako jeden z kluczowych czynników modulujących ujawnianie się fenotypów patogennych u bakterii, w tym u *P. aeruginosa*. Związek ten ma również duże znaczenie w komunikacji międzykomórkowej

i pełnieniu funkcji regulatorowych w procesie ekspresji genów. Działa jako induktor dla operonu antABC - kompleksu rozkładającego antranilan gdy jego stężenie w środowisku jest wysokie, a także jest prekursorem szlaku sygnałowego u *P. aeruginosa* PQS (ang. *Pseudomonas quinolone signal*), będącego regulatorem transkrypcji w celu pozytywnej kontroli wielu genów wirulencji [162]. Jest uznany jako sygnalizator procesów komórkowych, ponadto spełnia wszystkie istotne cechy cząsteczki sygnałowej. W trakcie prowadzonych badań nad właściwościami tego związku w kontekście zmiany oporności na antybiotyki wykazano, że jego obecność w pożywce wpływa na wzrost wrażliwości, w tym także u *Staphylococcus aureus* [163]. Z innych źródeł wynika, że jego wysokie stężenie w przestrzeni międzykomórkowej działa hamująco na tworzenie biofilmu, a własność ta została potwierdzona u gronkowca złocistego [164]. Połączenie tych dwóch faktów wskazuje że antranilan może wywoływać fizjologiczną zmianę, w otaczających komórkach i faworyzować te, które są zdolne do znoszenia jego wysokiego stężenia. Jeśli bakterie są dobrze przystosowane do rozkładania antranilanu, będą go wspólnie rozkładać, aby obniżyć jego poziom i dołączyć do tworzenia biofilmu, który dodatkowo zabezpiecza przed ksenobiotykami. Faworyzowani są kooperaci uczestniczący w degradacji. W rzeczywistości doniesiono, że komórki w biofilmie wykazują wysoką ekspresję antABC [187].

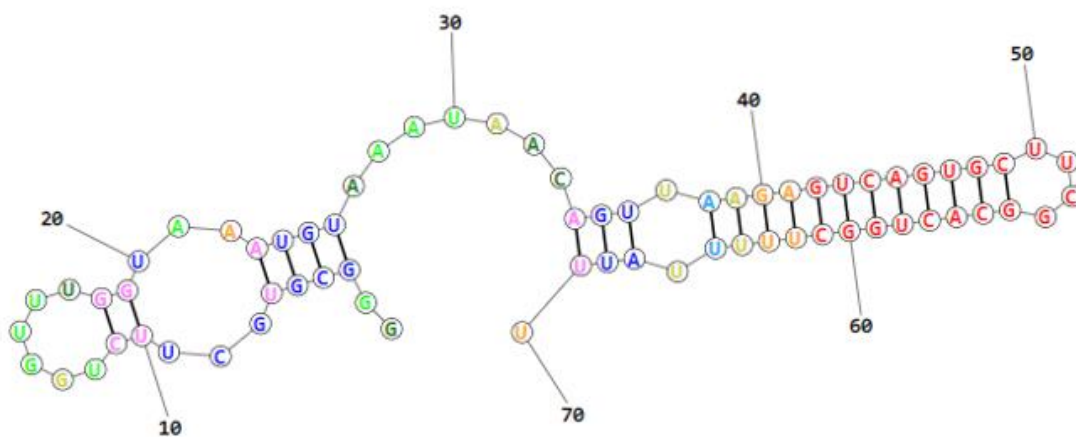
Syntaza antranilanu (TrpE) została wskazana jako obiecujący cel dla opracowania efektywnej terapii przeciw wielolekoopornemu szczepowi *Mycobacterium tuberculosis*. Motywacją w tym podejściu jest fakt, że szlak biosyntezy tryptofanu jest niezbędny dla przetrwania prątka gruźlicy, nie występuje zaś u człowieka. Biochemia tego szlaku stanowi potencjalne cele dla nowych leków, a podejście to zgodne jest z założeniem, że alternatywne cele w terapii przeciwdrobnoustrojowej powinny być skierowane na kluczowe dla funkcjonowania komórki komponenty szlaków metabolicznych. Na tej podstawie można wnioskować, że zidentyfikowany kandydat na ryboprzełącznik w obrębie genu kodującego komponent pierwszy kwasu antranilowego stanowi bardzo atrakcyjny cel molekularny. Zaburzenie prawidłowego działania mechanizmu regulującego ekspresję genu, którego funkcjonowanie niezbędne jest dla przeżycia komórki spełnia wymogi stawiane terapiom alternatywnym.

5.3.6 Ryboprzelącznik BA

Kolejnym zidentyfikowanym kandydatem na ryboprzelącznik jest sekwencja znajdująca się w regionie 5' UTR genu kodującego dwufunkcyjną autolizynę (ang. *Bifunctional autolysin*) (Rysunek 30). W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego znajduje się kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 31. Zgodnie z opisem w adnotacjach jest on związany z hydrolizą ściany komórkowej, a także przypisywaną mu funkcją jest kodowanie N-acetyloglukozaminy pochodzenia fagowego (ang. *phage N-acetylglucosamidase*).



Rysunek 30. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzelącznika BA. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



Probability >= 99%
 99% > Probability >= 95%
 95% > Probability >= 90%
 90% > Probability >= 80%
 80% > Probability >= 70%
 70% > Probability >= 60%
 60% > Probability >= 50%
 50% > Probability

Rysunek 31. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzelącznik BA znajdującego się w regionie 5' genu kodującego. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.

Dyskusja do 5.3.6

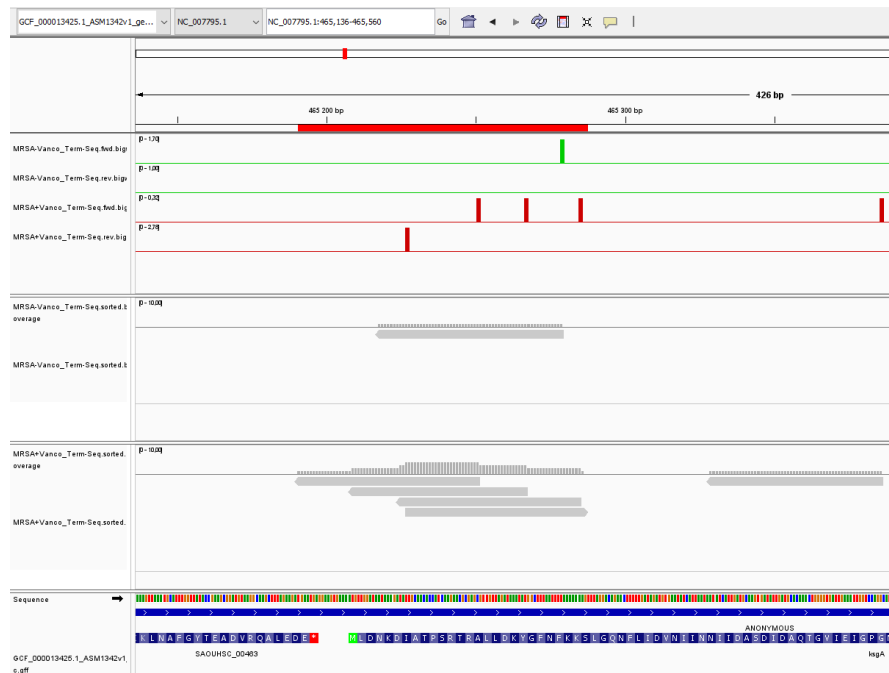
Badania przeprowadzone przez Dengcheng Yang i współpracowników nad plastycznością fenotypową w celu ujawnienia architektury genetycznej będącej odpowiedzią na rosnące stężenia wankomycyny u *Staphylococcus aureus* wykazały, że jednym z siedmiu genów zaangażowanych w powstawanie antybiotykooporności jest SAOUHSC_02023. Analiza ta została przeprowadzona poprzez wdrożenie dynamicznego modelu mapowania genetycznego wykorzystującego śledzenie zmian zachodzących w trakcie adaptacji do wankomycyny. Po analizie zmienności genotyp-fenotyp u 99 szczepów *S. aureus*, których hodowla prowadzona była w obecności wankomycyny w stężeniach 0, 2, 4 oraz 6 mg/l zidentyfikowano 78 znaczących polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, a także siedem genów odgrywających kluczową rolę w tym procesie [165]. Dwufunkcyjna autolizyna jest zaangażowana w podział komórkowy, tworzenie komórek potomnych, a także autolizę. W stresie wywołanym wankomycyną procesy te wydłużają się w wyniku reorganizacji i pogrubienia ściany komórkowej, co jednocześnie ogranicza dyfuzję antybiotyku w okolice miejsca najbardziej narażonego na jego działanie, czyli rejonu septum podziałowego [107].

Obserwacja ta jest zgodna z wyznaczonym przeze mnie w niniejszej pracy czasem generacji dla hodowli w obecności wankomycyny (Tabela 8). Skrócony transkrypt w tym regionie może wskazywać na przedwczesną terminację transkrypcji tego genu przez ryboprzełącznik co przekłada się na wydłużony czas podziału komórki. Obserwacja ta wymaga dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

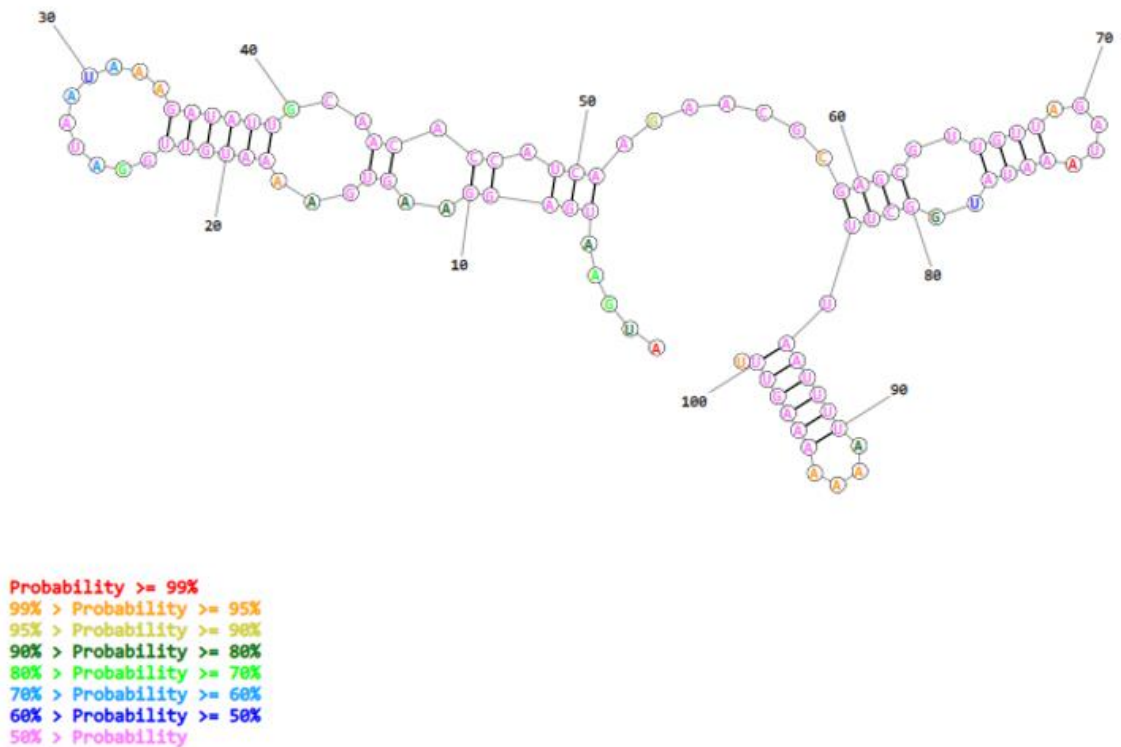
Z dostępnej literatury przedmiotu wynika, że dwufunkcyjna autolizyna będąca produktem genu *atl* jest niezwykle obiecującym celem dla projektowania nowych antybiotyków. Obecne w komórce enzymy hydrolityczne zapewniają plastyczność ściany komórkowej gronkowców poprzez przetwarzanie złożonej sieci peptydoglikanu. Jednym z nich jest AtlA, który rozszczepia sieć peptydoglikanu w dwóch różnych miejscach w trakcie podziału komórki. Mutanty delecyjne wykazują poważnie upośledzony fenotyp charakteryzujący się komórkami niezdolnymi do proliferacji i nieuporządkowanym wzorcem podziałów. Odkrycia te wskazują na kluczową rolę dwufunkcyjnej autolizyny w cyklu życiowym *S. aureus*, a także podkreślają terapeutyczny potencjał swoistego hamowania AtlA [166]. Istotnym z punktu widzenia potencjału terapeutycznego jest wielofunkcyjność jaką wykazuje dwufunkcyjna autolizyna. Jej obszar oddziaływań obejmuje każdy aspekt przejawianej wirulencji. Białko Atl oprócz swojej klasycznej funkcji odgrywa ważną rolę w inwazji bakterii poprzez wiązanie się z białkami gospodarza takimi jak : fibronektyna, fibrynogen, witronektyna i heparyna. Wskazano również na pełnienie roli w inicjacji oraz blokowaniu syntezy biofilmu [167]. Autolizyna tworząc przegrodę podziałową pośredniczy w sekrecji białek cytoplazmatycznych, dla których staje się ona miejscem przecieku [168]. Co więcej, uczestnicząc w lizie subpopulacji komórek, prowadzi do uwolnienia genomowego DNA do macierzy zewnątrzkomórkowej, którego obecność wzmacnia integralność komórek [169]. Osłabienie funkcji działania zaledwie tego jednego enzymu miałoby krytyczny wpływ na upośrodkowanie mechanizmów związanych z ujawnianiem się oporności na wankomycynę oraz wirulencję.

5.3.7 Ryboprzełącznik DT

W regionie 5'UTR genu kodującego transferazę dimetyloadenozynową (ang. *Dimethyladenosine transferase*) zidentyfikowana została sekwencja spełniająca wszystkie kryteria kandydata na ryboprzełącznik (Rysunek 32). Produkt genu *ksgA* katalizuje transfer czterech grup metylowych z S-adenozylometioniny (S-AdoMet) na dwie sąsiadujące zasady adenozyne A1518 i A1519 w 16S rRNA. Natomiast mutacje w genie *ksgA* powodują oporność na inhibitory inicjacji translacji, takie jak kasugamycyna. W Tabeli 9 przedstawione zostały cechy identyfikacyjne genu, w obrębie którego znajduje się kandydat. Sekwencja odczytu (Tabela 10) z tego regionu została wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure i przedstawiona na Rysunku 33.



Rysunek 32. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika DT. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.



Rysunek 33. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzelącznik DT znajdującego się w regionie 5' genu kodującego transferazę dimetyloadenozynową. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.

Dyskusja do 5.3.7

Transferaza dimetyloadenozynowa odpowiada za powstawanie potranskrypcyjnych modyfikacji w rRNA. Ponieważ obejmują one metylacje rybosomalnego RNA w rejonie odpowiedzialnym za interakcję pomiędzy podjednostkami rybosomu (ang. *interface*), a także w centrum oddziaływań z mRNA uważa się je za istotne z punktu widzenia funkcji rybosomów. Na ekspresję metylotransferaz wpływa stres środowiskowy, a w tym obecność antybiotyków, wahania temperaturowe czy szeroko rozumiany stres oksydacyjny. KsgA jest konserwatywny wśród bakterii, archeonów i eukariontów i bierze udział w metylacji adenozyne w pozycji A1518 i A1519 16S rRNA, jak i również odgrywa rolę we właściwym upakowaniu helis h45, h44 i h24a. Powstałe w wyniku jego działania metylacje na powierzchni podjednostek 30S pełnią funkcję łącznika pomiędzy podjednostkami 30S i 50S. Od aktywności KsgA zależna jest także biogeneza małej podjednostki rybosomalnej oraz recykling rybosomów [170]. Z dotychczas przeprowadzonych badań nad dokładną funkcją KsgA u *Staphylococcus aureus* wynika, że nie jest niezbędny dla przeżycia komórki. Jednakże delecja *ksgA* u *S. aureus* doprowadza do ujawnienia się fenotypu

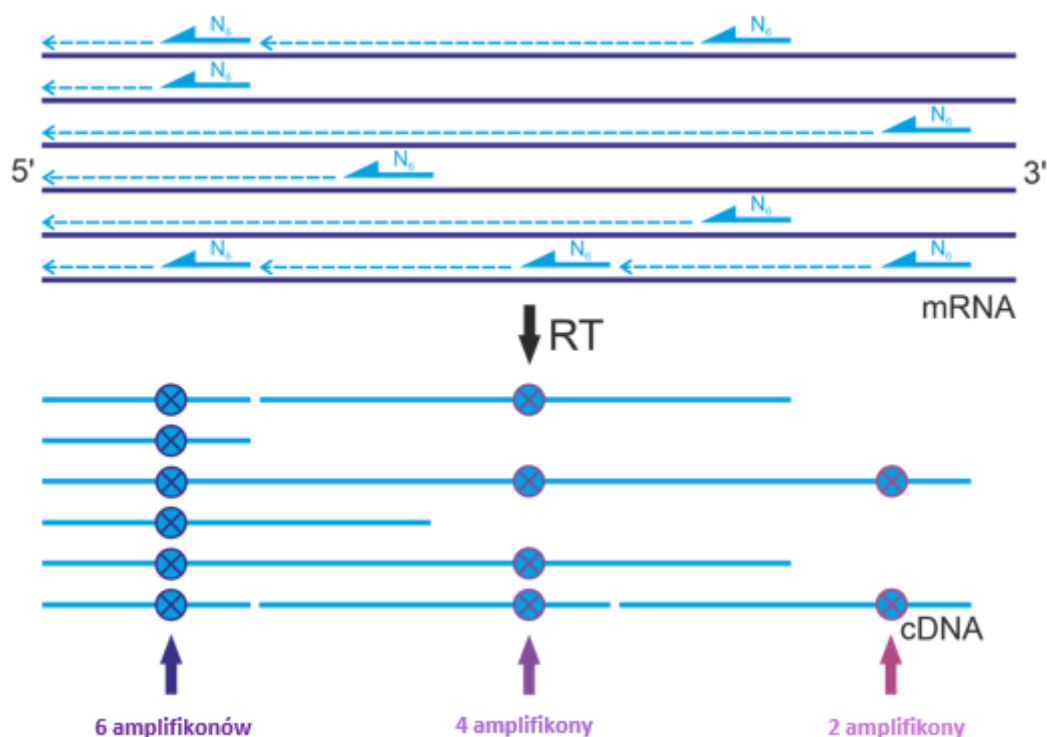
wrażliwego na zimno, a także wykazującego zwiększoną wrażliwość na antybiotyki aminoglikozydowe [171]. Przeprowadzona przez Wang i współpracowników analiza wzorców zmienności genetycznej dotyczącej czynników oporności na antybiotyki oraz mechanizmów wirulencji u wielolekoopornej bakterii *Glaesserella parasuis* wykazała wspólne dla 55 izolatów i 34 szczepów determinanty. Jednym spośród czterech zidentyfikowanym genem oporności został *ksgA*, przypisany został jako determinant oporności we wszystkich badanych izolatach niezależnie od źródła izolacji czy szerokości geograficznej pobrania próby [172]. Dodatkowo analiza transkryptomu w badaniach nad mechanizmem działania antybiotyku amikumacyny A o silnym działaniu bakteriobójczym wobec metycylinoopornego szczepu gronkowca złocistego wykazała pojawianie się mutacji punktowej w obrębie genu *ksgA* charakterystycznej dla mutantów opornych [173]. Zgodnie z sugestią zaproponowaną przez Heather C O' Farrell, celowanie w czynniki wirulencji i oporności mogą być lepszą strategią dla alternatywnych terapii przeciwdrobnoustrojowych ze względu na większą specyficzność i ograniczanie ryzyka naruszenia bioróżnorodności mikrobioty jelitowej w przypadku leczenia zakażeń u ludzi [171].

Słowem podsumowania tej części wyników w jednej z prac z 1999 roku analizy genetyczne i biochemiczne MRSA wykazały, że spośród niemal tuzina opisanych dotychczas mutacji pomocniczych w ujawnianiu się antybiotykooporności większość dotyczy genów zaangażowanych w syntezę ściany komórkowej oraz funkcje regulacyjne, co sugeruje że optymalne wyrażanie oporności może wymagać współdziałania kilku genów w metabolizmie ściany komórkowej i odpowiedzi na stres. Kontynuacja analiz wykazała że dwiema największymi grupami genów pomocniczych są kinazy białkowe, transportery ABC oraz białka kontrolujące katabolizm [174]. Wysoce prawdopodobne jest zatem, że zidentyfikowane w tej pracy potencjalne ryboprzełączniki zaangażowane są w regulację wskazanych genów w wyniku stresu antybiotykowego. Jednoznacznie wskazać można spójność pomiędzy uzyskanymi wynikami niniejszej rozprawy doktorskiej a doniesieniami dostępnej literatury przedmiotu. Zaproponowane ryboprzełączniki mogą być podstawą do dalszych badań nad wykorzystaniem ich jako celi w antybiotykoterapii. Wzbogacenie antybiotyku o substancję będącą ligandem dla wskazanych ryboprzełączników może stanowić alternatywę dla adjuwantów i przyczynić się do zahamowania procesów opornościowych u metycylinoopornego szczepu gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA.

5.4 Weryfikacja biochemiczna aktywności potencjalnych ryboprzełączników w warunkach stresu antybiotykowego.

Zidentyfikowane przeze mnie z zastosowaniem metody Term-seq i predykcji strukturalnej potencjalne ryboprzełączniki poddane zostały biochemicznej weryfikacji eksperymentalnej, zgodnie z opracowaną w 2022 roku w Zakładzie Transkryptomiki Funkcjonalnej metodą PTT-quant (ang. *premature transcription termination quantification*) [176]. Innowacyjność tego podejścia polega na umożliwieniu bezwzględnego ilościowego pomiaru zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji będących wynikiem działania ryboprzełączników.

Ocena efektywności zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji obarczona jest błędami wynikającymi z ograniczeń metodologicznych. Obecnie najczęściej wykorzystywane metody działają w oparciu o technikę RT-PCR, w której do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji stosuje się heksamery o losowej sekwencji (ang. *random hexamers*, N6). Ich zastosowanie w sposób bezpośredni wpływa na ilość odczytów wzdłuż transkryptu. W wyniku działania heksamerów o losowej sekwencji obserwuje się nadreprezentację końca 5' względem końca 3', co spowodowane jest kierunkiem działania odwrotnej transkryptazy. Mechanizm ten skutkuje niemal całkowitym pokryciem końca 5' i niedoszacowaniem 3' [175]. Różnica ta jest tym większa im dłuższy transkrypt przepisywany zostaje na cDNA (Rysunek 34). Ze względu na fakt, że ryboprzełączniki zlokalizowane są w 5'UTR, różnice te utrudniają rzeczywiste oznaczenie stężenia transkryptów skróconych. Dodatkowym ograniczeniem powszechnie stosowanych metod jak RT-qPCR jest brak możliwości określenia dokładnej liczby kopii transkryptów skróconych w jednostkach absolutnych jak ilość kopii w określonej objętości próby.

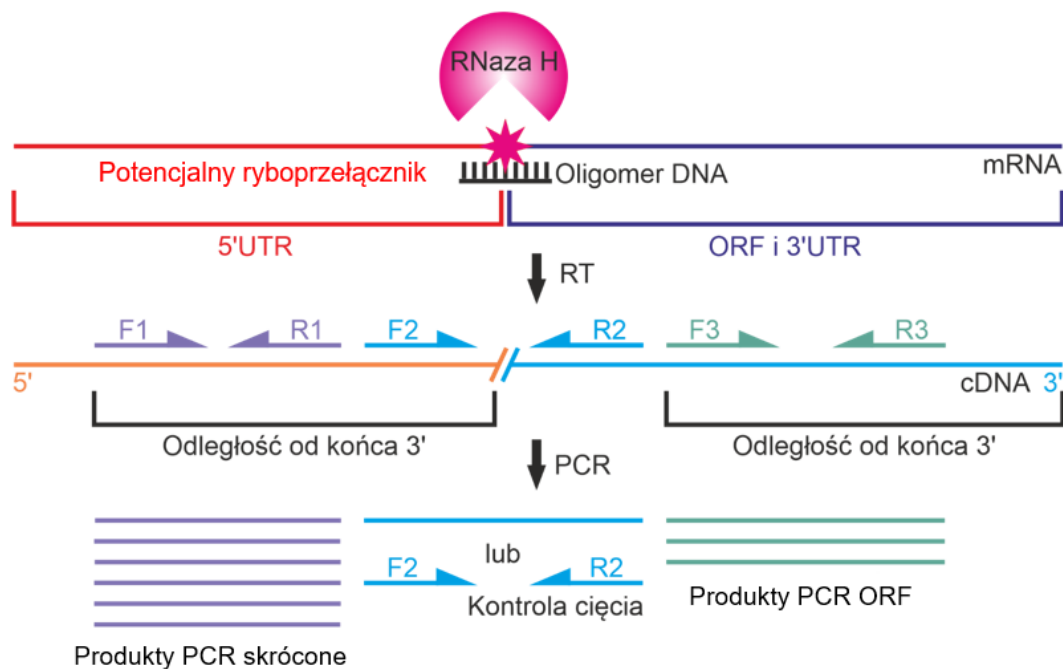


Rysunek 34. Zależność liczby kopii cDNA od odległości od końca 3' transkryptu. Opracowanie własne na podstawie Machtel et al. 2022 [176]. RT- odwrotna transkrypcja, N6- losowe heksamery, startery reakcji odwrotnej transkrypcji.

Zastosowanie metody PTT-quant umożliwia analizę aktywności transkrypcyjnej rybobprzełączników dzięki wykorzystaniu endonukleolitycznego cięcia transkryptów mRNA przy pomocy RNazy H w miejscu zdefiniowanym przez zaprojektowany oligonukleotyd DNA. Działanie to ma na celu wyeliminowanie problemu związanego z ilością kopii cDNA nie będących realnym odwzorowaniem rzeczywistego końca 3' transkryptu. W odpowiedzi na drugi element limitujący związany z ilościowym oznaczeniem transkryptów skróconych oraz pełnej długości zastosowano wykazujący się większą precyzją niż RT-qPCR emulsyjny PCR (ang. *droplet digital PCR*, ddPCR).

Zgodnie z zamieszczonym schematem postępowania (Rysunek 35) dla każdego transkryptu, w obrębie, którego zidentyfikowałam potencjalny rybobprzełącznik zaprojektowałam oligonukleotyd DNA zgodnie z wytycznymi mówiącymi o długości (od 20 do 24 nukleotydów) i komplementarności do sekwencji poniżej miejsca przedwczesnej terminacji transkrypcji, tuż za traktem poliU. Następnie przy pomocy algorytmu BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) zaprojektowałam po trzy pary starterów, zgodnie z następującymi regułami. Pierwsza para starterów (F1/R1) komplementarna do regionu 5'UTR, czyli sekwencji zawierającej potencjalny

ryboprzełącznik. Produkty amplifikacji z tego odcinka reprezentują sumę wszystkich transkryptów, zarówno pełnej długości jak i przedwcześnie skróconych w wyniku działania ryboprzełącznika. Para starterów numer 2 (F2/R2) flankuje miejsce cięcia RNazą H i stanowi kontrolę efektywności jej działania. Natomiast para starterów numer 3 została zaprojektowana tak, by produkt amplifikacji odzwierciedlał transkrypt otwartej ramki odczytu. Ta pula amplifikonów odzwierciedla tylko transkrypty pełnej długości. Wszystkie pary starterów zaprojektowane zostały tak, aby amplifikowane produkty miały długość około 200 nukleotydów. Dodatkowo dla minimalizacji wpływu odległości starterów od 3' końca na ilość kopii cDNA, pary starterów 1 i 3 zaprojektowano w równej odległości od końca 3' transkryptu: powstałego po cięciu RNazą H (para starterów numer 1) lub naturalnego końca pełnej długości transkryptu (para starterów 3).



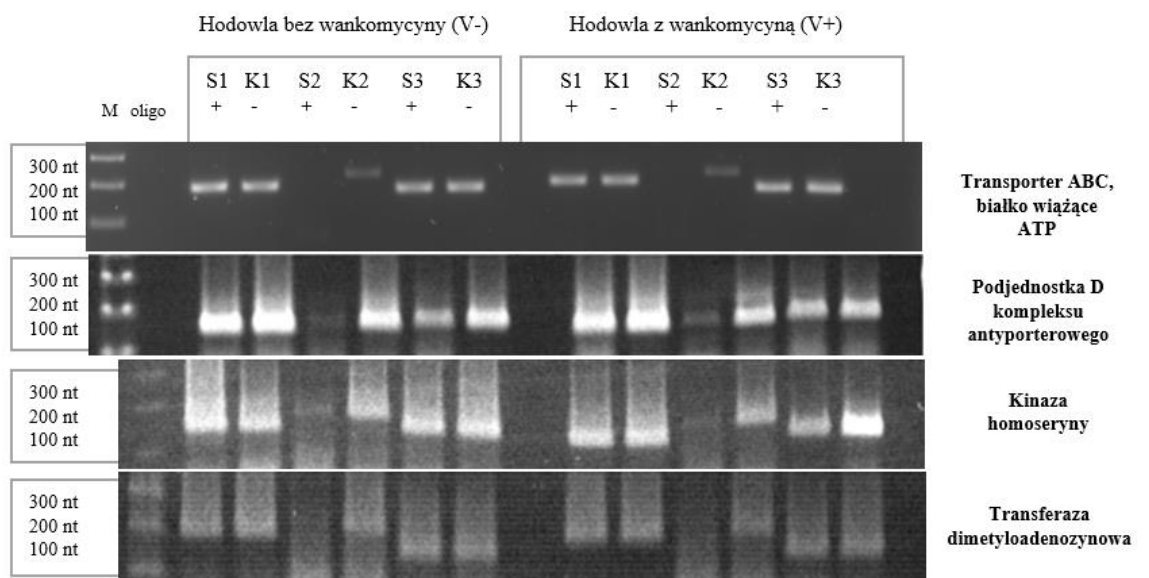
Rysunek 35. Analiza aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników zgodnie z metodą PTT-quant. Opracowanie własne na podstawie Machtel et al. 2022 [176].

5.4.1 Kontrola cięcia transkryptów *ex vivo* z wykorzystaniem RNazy H

Pierwszym etapem określenia aktywności transkrypcyjnej potencjalnych ryboprzełączników zgodnie z metodą PTT-quant jest potwierdzenie specyficzności cięcia RNazą H wybranych transkryptów w puli całkowitego RNA komórki. Reakcja cięcia przeprowadzona została na wyizolowanym i oczyszczonym całkowitym RNA pochodzącym z hodowli kontrolnej oraz hodowli z antybiotykiem (wankomycyna o stężeniu 2 mg/l). W tym celu użyto 100 ng RNA dla każdego warunku

i przeprowadzono inkubację w obecności specyficznego oligonuklotydu DNA o stężeniu 100 nM oraz RNazy H (rozdział 6.4.10). Ze względu na brak możliwości śledzenia pojedynczego transkryptu mRNA w puli całkowitego RNA konieczne było przepisanie pociętych transkryptów na cDNA. Bezpośrednie potwierdzenie specyficzności działania RNazy H w zdefiniowanym przez oligomer DNA miejscu możliwe jest dzięki wizualizacji przez rozdział elektroforetyczny. W tym celu przeprowadzono reakcję PCR przy pomocy starterów numer 2, a także dla pozostałych starterów 1 i 3 celem oceny poprawności ich zaprojektowania.

W przypadku każdego kandydata na ryboprzełącznik przeprowadzonych zostało po 6 reakcji dla hodowli z wankomycyną (V+) jak i kontrolnej (V-). Produkty S1, S2 oraz S3 odpowiadają RNA z oligonuklotydem DNA po cięciu RNazą H natomiast K1, K2, K3 to reakcje kontrolne (bez reakcji cięcia RNazą H, z oligonuklotydem DNA), dla których matrycą było niezmienione całkowite RNA (Rysunek 36, Rysunek 37). Oczekiwany obraz żeli to widoczny brak produktu amplifikacji w ścieżce S2, świadczący o endonukleolitycznym cięciu w zdefiniowanym przez zaprojektowany oligonukleotyd DNA miejscu. Dla pozostałych 5 ścieżek oczekiwanym wynikiem jest obecność produktu amplifikacji o długości około 200 nukleotydów.

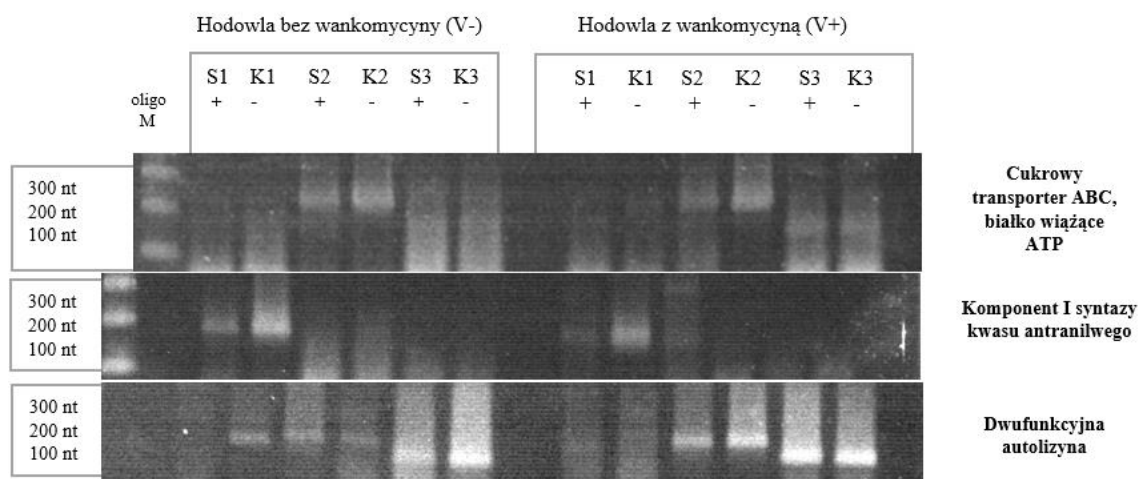


Rysunek 36. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR po endonukleolitycznym cięciu RNazą H transkryptów izolowanych jako pula RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.

Spodziewany rezultat został osiągnięty dla czterech kandydatów na ryboprzełączniki. Na tej podstawie do dalszej weryfikacji eksperymentalnej wyselekcjonowałam następujące transkrypty: transporter ABC, białko wiążące ATP (Ryboprzełącznik PABCT), podjednostka D kompleksu antyporterowego *mnhF* (Ryboprzełącznik MCAS), kinaza homoseryny *thrB* (Ryboprzełącznik HSK) oraz transferaza dimetyloadenozynowa *ksgA* (Ryboprzełącznik DT).

Uzyskany obraz rozdziału elektroforetycznego (Rysunek 36) czterech transkryptów potwierdził poprawność zaprojektowanego oligomeru DNA oraz par starterów S1, S2 i S3. W każdym przypadku w ścieżce odpowiadającej S2 obserwowano brak produktu w przeciwieństwie do kontroli K2. Wynik ten świadczy o hydrolitycznym cięciu wybranego znajdującego się w puli transkryptów *ex vivo* RNazą H w miejscu wyznaczonym przez zaprojektowany oligonuklotyd DNA. W pozostałych ścieżkach odpowiadających produktom amplifikacji starterów numer 1 i 3 oraz ich kontrolom obserwowalny jest prążek na wysokości około 200 nukleotydów.

Dla pozostałych trzech transkryptów odpowiadających cukrowemu transporterowi ABC, białku wiążącemu ATP (Ryboprzełącznik MST), komponentowi I syntazy kwasu antranilowego (Ryboprzełącznik ASC) oraz dwufunkcyjnej autolizynie (Ryboprzełącznik BA) zastosowane Oligomery DNA nie wywołały endonukleolitycznego cięcia mRNA (Rysunek 37). Obserwowalny jest wyraźny prążek na wysokości kontroli w ścieżce S2. Dla transkryptu odpowiadającego komponentowi pierwszemu syntazy kwasu antranilowego (SAOUHSC_01366) nie zaobserwowałam produktów amplifikacji par starterów 2 i 3, co uniemożliwiło ocenę cięcia RNazą H i wykluczyło tego kandydata na ryboprzełącznik z dalszych analiz.



Rysunek 37. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR po endonukleolitycznym cięciu RNazą H transkryptów izolowanych jako pula RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.

5.4.2 Ocena aktywności regulatorowej wybranych kandydatów na ryboprzełączniki.

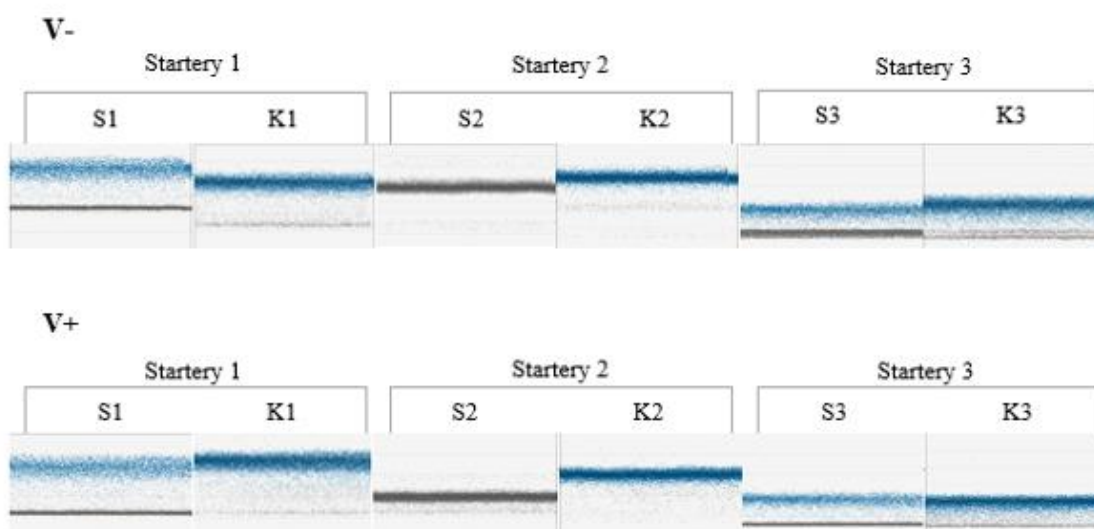
Zgodnie z uzyskanymi wynikami w rozdziale 5.4.1 do ilościowego pomiaru zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji, będących wynikiem aktywacji ryboprzełączników podczas stresu antybiotykowego wybrane zostały mRNA kodujące: białko wiążące ATP białka transporterowego ABC, podjednostkę D kompleksu antyporterowego, kinazę homoseryny *thrB* oraz transferazę dimetyloadenozynową oraz odpowiadające im potencjalne ryboprzełączniki: Ryboprzełącznik PABCT, Ryboprzełącznik MCAS, Ryboprzełącznik HSK, Ryboprzełącznik DT. Wykorzystany w tym celu emulsyjny PCR (ddPCR) umożliwił absolutną kwantyfikację wybranych transkryptów mRNA spośród puli całkowitego RNA bez konieczności odniesień do krzywych standardowych czy genu referencyjnego. Metoda ddPCR oparta jest na technologii emulsyjno-kropelkowej umożliwiającej podział pojedynczej próby na 20 000 kropel w czasie rzeczywistym, spośród których każda zawiera wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej. Zakłada się, że na pojedynczą kroplę przypada jeden transkrypt, jednakże przy wyższych stężeniach założenie to nie jest prawdziwe. Wówczas prawidłowe oznaczenie ilości kopii transkryptu możliwe jest poprzez wprowadzenie korekty Poisson'a. Czuła i precyzyjna detekcja pojedynczych kopii DNA odbywa się na zasadzie wykrywania fluorescencji, sygnał świetlny następuje po związaniu dwuniciowych cząsteczek DNA w trakcie amplifikacji. Uzyskany obraz z analizy jest

graficznym przedstawieniem zbioru kropel pozytywnych oznaczonych kolorem niebieskim lub zielonym oraz negatywnych- szarych, w których reakcja PCR nie zaszła.

Do przeprowadzenia reakcji ddPCR opisanej w rozdziale 4.5.10 wykorzystane zostało cDNA przepisane ze 100 ng RNA poddanego cięciu RNazą H z wybranym oligomerem DNA. Chronologia nakładania prób jest analogiczna jak w kontroli cięcia transkryptów *ex vivo*. Dla każdej pary starterów przeprowadzono reakcję na RNA z oligomerem DNA oraz kontroli we właściwym warunku. Graficzne przedstawienie wyników po przeprowadzonej reakcji ddPCR było możliwe dzięki programowi QuantaSoft.

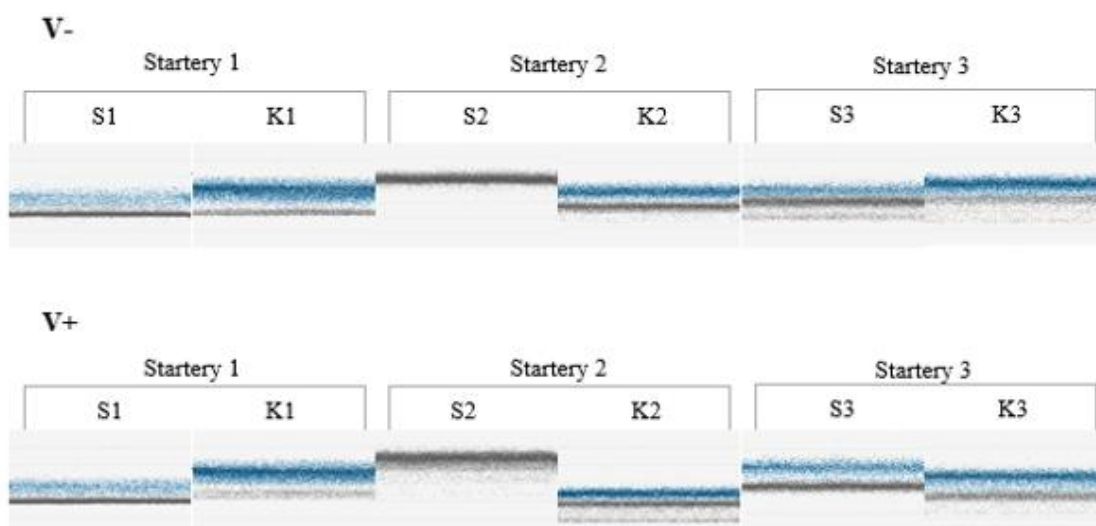
Analiza uzyskanego obrazu umożliwia dostrzeżenie różnic w ilości transkryptów pomiędzy warunkami. Wyższe stężenie wyjściowe konkretnego mRNA przekłada się na większą ilość kopii cDNA, a ostatecznie na ilość produktu PCR, czyli ilość kropli pozytywnych. Uzyskane wyniki ddPCR potwierdziły obserwację z kontroli cięcia transkryptów *ex vivo*, gdzie zastosowanie specyficznego oligonukleotydu DNA skutkuje brakiem produktu amplifikacji z zastosowaniem pary starterów numer 2 w przypadku czterech wybranych transkryptów: białka wiążącego ATP transportera ABC, podjednostki D kompleksu antyporterowego, kinazie homoseryny oraz transferazie dimetyloadenozynowej. Na Rysunkach 38, 39, 40, 41 przedstawiony został obraz uzyskanych wyników.

Podjednostka D kompleksu antyporterowego



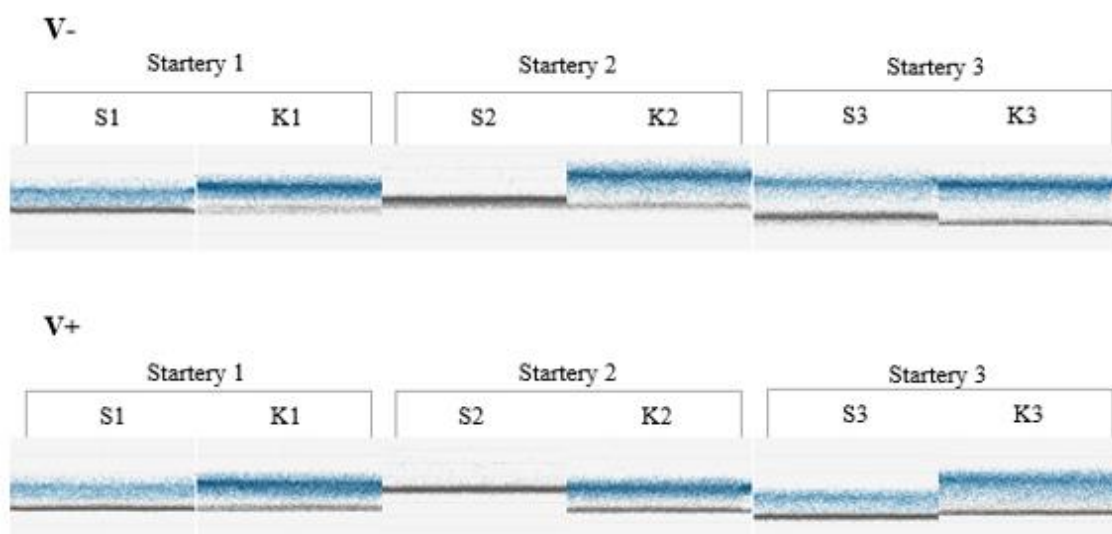
Rysunek 38. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.

Transporter ABC, białko wiążące ATP



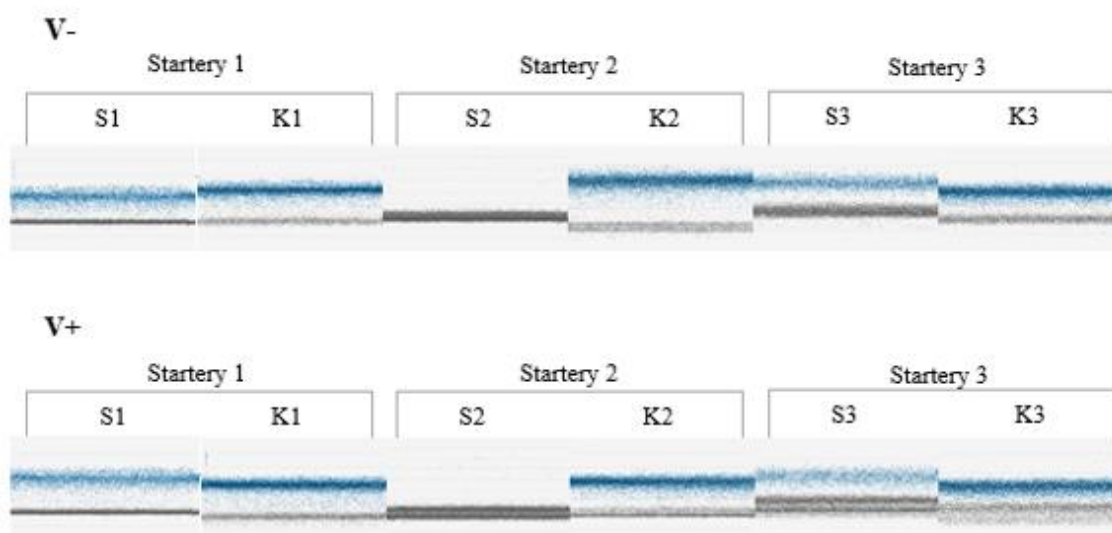
Rysunek 39. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Transporter ABC, białko wiążące ATP. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.

Kinaza homoseryny



Rysunek 40. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Kinazę homoseryny. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.

Transferaza dimetyloadenozynowa



Rysunek 41. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Transferazę dimetyloadenozynową. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.

Spośród testowanych kandydatów na ryboprzełączniki dla trzech (znajdujących się w 5'UTR mRNA kodującego białko wiążące ATP białka transporterowego ABC – Ryboprzełącznik PABCT, kinazę homoseryny – Ryboprzełącznik HSK oraz transferazę dimetyloadenozynową – Ryboprzełącznik DT), zaobserwowano tendencję spadkową ilości transkryptów pełnej długości (para starterów numer 3) w hodowli z wankomycyną, w odniesieniu do kontroli. Tendencja ta zauważalna jest zarówno dla prób z oligomerem DNA jak i bez.

W przypadku mRNA kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego (Ryboprzełącznik MCAS) obserwacja nie jest jednoznaczna. Dla prób gdzie zastosowano oligonuklotyd DNA tendencja jest analogiczna (większe stężenie transkryptów pełnej długości w kontroli) jednakże dla prób nie poddanych cięciu RNazą H obserwuje się wyższe stężenie transkryptów pełnej długości w stresie antybiotykowym.

wankomycyna	S1 [kopie/μl]	K1 [kopie/μl]	S2 [kopie/μl]	K2 [kopie/μl]	S3 [kopie/μl]	K3 [kopie/μl]
Białko wiążące ATP białka transporterowego ABC, Ryboprzełącznik PABCT						
-	647	1 699	0	811	489	1 387
+	555	1 527	0	756	336	1 115
Podjednostka D kompleksu antyporterowego (<i>mnhF</i>), Ryboprzełącznik MCAS						
-	776	2 487	4	3 726	577	1 959
+	653	2 833	0	3 750	474	2 337
Kinaza homoseryny (<i>thrB</i>), Ryboprzełącznik HSK						
-	687	2 110	5	1 904	649	1 567
+	503	1 730	15	1 272	424	1 133
Transferaza dimetyloadenozynowa (<i>ksgA</i>), Ryboprzełącznik DT						
-	620	1 664	3	1 574	467	1 358
+	534	1 509	0	1 333	313	1 104

Tabela 11. Stężenia transkryptów dla wybranych genów w poszczególnych warunkach hodowli (kontrola oraz w obecności wankomycyny 2 mg/l). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.

5.4.3 Współczynnik indukcji kandydatów na ryboprzełączniki *S. aureus* MRSA podczas stresu antybiotykowego.

Głównym zamysłem przeprowadzenia emulsyjnego PCR było uzyskanie dokładnej liczby kopii transkryptów [kopie/μl] w celu określenia wskaźnika indukcji wybranych kandydatów na ryboprzełączniki w warunkach stresu antybiotykowego

wankomycyny 2 mg/l. Wartości te zostały obliczone zgodnie z zapisem zawartym w Równaniu 2 oraz następującą regułą: współczynnik indukcji IR (ang. *induction rate*) wyraża stosunek stężeń transkryptów pełnej długości FL (ang. *full lenght*) do transkryptów skróconych T (ang. *truncated*) w warunkach hodowli z wankomycyną oznaczonej jako *van+* oraz kontrolnej oznaczonej jako *van-* i został przeliczony zgodnie z równaniem:

$$IR = \frac{\frac{S3_{van-}}{S1_{van-} - S3_{van-}}}{\frac{S3_{van+}}{S1_{van+} - S3_{van+}}} = \frac{\frac{FL_{van-}}{T_{van-}}}{\frac{FL_{van+}}{T_{van+}}}$$

Równanie 2. Współczynnik indukcji ryboprzełącznika.

Mając do dyspozycji stężenia produktów pochodzących z amplifikacji z zastosowaniem par starterów 1 i 3 obliczone zostało stężenie transkryptów będących produktami przedwczesnej terminacji transkrypcji oznaczonych jako T. Uzyskane wartości przedstawione w Tabeli 12 sygnalizują zbliżoną dynamikę wzrostu ilości transkryptów skróconych w trakcie stresu antybiotykowego dla trzech genów (białko wiążące ATP białka transporterowego ABC, kinaza homoseryny, transferaza dimetyloadenozynowa). W przypadku podjednostki D kompleksu antyporterowego obserwowalna tendencja jest odwrotna, w trakcie stresu antybiotykowego ilość transkryptów skróconych maleje. W tym przypadku nie obserwuje się rozbieżności pomiędzy próbami gdzie zastosowano oligomer DNA wraz z cięciem RNazą H, a kontrolą (całkowite RNA bez cięcia RNazą H w obecności oligonukleotydu DNA).

Nazwa	Cięcie RNazą H	V- [kopie / µl]			V+ [kopie / µl]		
		FL+T (S1)	FL (S3)	T (S1-S3)	FL+T (S1)	FL (S3)	T (S1-S3)
Ryboprzełącznik PABCT	+	647	489	158	555	336	219
	-	1 699	1 387	312	1 527	1 115	409
Ryboprzełącznik MCAS	+	776	577	199	653	474	179
	-	2 487	1 959	528	2 833	2 337	496
Ryboprzełącznik HSK	+	687	649	38	503	424	79
	-	2 110	1 567	79	1 730	1 133	597
Ryboprzełącznik DT	+	620	467	153	534	313	221
	-	1 664	1 358	306	1 509	1 104	405

Tabela 12. Stężenia transkryptów wybranych genów w poszczególnych warunkach hodowli (V- kontrola, V+ w obecności wankomycyny 2 mg/l). FL- transkrypt ORF, T- transkrypt skrócony, FL+T- suma transkryptów

Na podstawie wartości stężeń zebranych w Tabeli 12 obliczony został wskaźnik indukcji ryboprzełącznika IR dla wybranych kandydatów. Współczynnik określono zarówno dla prób z oligomerem DNA jak i kontrolnych. Zamysłem tego działania jest określenie o jaki procent wynik pochodzący z prób poddanych cięciu RNazą H jest dokładniejszy, to znaczy w jakim stopniu przecięcie transkryptów eliminuje problem nadreprezentacji końca 5'. Dla dwóch genów, białka wiążącego ATP białka transporterowego ABC oraz transferazy dimetyloadenozynowej wskaźnik ten jest dokładniejszy o około 20%, co jest zgodne z założeniem metody [176]. Dla kinazy homoseryny wskaźnik ten poprawił się, aż o 52%, natomiast dla podjednostki D kompleksu antyporterowego o około 30%. W warunkach stresu antybiotykowego wankomycyny o stężeniu 2 [mg/l] współczynnik indukcji ryboprzełączników wynosi od 1,09 do 3,18, średnio 2.

Nazwa	Oligomer DNA	IR
Ryboprzełącznik PABCT	-	1,61
	+	2,01
Różnica [%]		20%
Ryboprzełącznik MCAS	-	0,78
	+	1,09
Różnica [%]		28,5%
Ryboprzełącznik HSK	-	1,52
	+	3,18
Różnica [%]		52,2%
Ryboprzełącznik DT	-	1,63
	+	2,06
Różnica [%]		20,88%

Tabela 13. Zestawienie współczynników indukcji IR poszczególnych transkryptów w próbach poddanych cięciu RNazą H oraz kontroli.

5.4.4 Dyskusja do 5.4

Metoda PTT-quant pozwala na ilościowe oznaczenie transkryptów skróconych jako zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji w identyfikacji ryboprzełączników. Wykazałam, że technika ta umożliwiła weryfikację eksperymentalną wybranych mechanizmów regulatorowych RNA w metycylinoopornym szczepie gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* MRSA w trakcie stresu antybiotykowego wankomycyną. Jednym z największych wyzwań stanowiło zaprojektowanie oligomeru DNA, które w mieszaninie cząsteczek całkowitego RNA będzie specyficznie oddziaływać z jednym wybranym transkryptem. Nie udało się tego dokonać dla trzech wybranych kandydatów: Ryboprzełącznika BA zidentyfikowanego w 5'UTR dwufunkcyjnej autolizyny, Ryboprzełącznika MST zidentyfikowanego w 5'UTR białka wiążącego ATP pośredniczącego w transporcie cukrów oraz Ryboprzełącznika ASC zidentyfikowanego w 5'UTR syntazy kwasu antranilowego. W przypadku ostatniego wymienionego problem stanowiło również zaprojektowanie specyficznych starterów, w wyniku czego ocena poprawności zaprojektowanego oligomeru DNA była ograniczona. Trudność z zastosowaniem oligomeru DNA polega na ryzyku niespecyficznych oddziaływań, w wyniku których ilość cząsteczek oligomeru DNA dostępnego dla specyficznych oddziaływań maleje i nie dochodzi do oczekiwanej interakcji. Dodatkowo sekwencja docelowa mRNA może być niedostępna ze względu na uwięzienie w strukturze drugorzędowej lub wyższej. Jednakże dla czterech spośród siedmiu kandydatów na ryboprzełączniki zaobserwowałam endonukleolityczne cięcie z wykorzystaniem RNazy H w ściśle zdefiniowanym przez zaprojektowany oligodeoksynuklotyd miejscu. Celem tego działania jest minimalizacja nadreprezentacji końca 5', a w konsekwencji spadek ilości odczytów pochodzących z amplifikacji produktów dla pary starterów numer 1.

Efektywne cięcie RNazą H umożliwiło przejście do kolejnego etapu, którym było wykonanie emulsyjnego ddPCR. Dzięki tej metodzie określone zostało stężenie transkryptów skróconych jako różnica ilości produktów ddPCR pochodzących z amplifikacji par starterów 1 i 3. Dotychczas stosowane metody skupiały się głównie na określeniu stężenia transkryptów tylko pełnej długości [177] co sprawia, że część informacji zostaje pominięta. W niniejszej pracy sytuacja ta również miałaby miejsce w przypadku podjednostki D kompleksu antyporterowego, gdzie na podstawie transkryptów pełnej długości wniosek był niejednoznaczny, a szersze spojrzenie na to zdarzenie umożliwiło dopiero oznaczenie transkryptów skróconych T. Ilość produktów

pełnej długości FL również została przeanalizowana co posłużyło za wcześniejszą, ocenę wstępną. Zgodnie z danymi zamieszczonymi w Tabeli 12 dla wszystkich kandydatów obserwowano podobną tendencję zwiększonej ilości FL w kontroli w odniesieniu do hodowli z antybiotykiem. Obserwacja ta może wskazywać na negatywną kontrolę ze strony ryboprzełącznika w warunkach stresu antybiotykowego.

Dalsza weryfikacja polegająca na określeniu stężenia transkryptów skróconych T poskutkowała uzyskaniem spójnej obserwacji. W trakcie stresu antybiotykowego wankomycyną o stężeniu 2 mg/l ilość transkryptów będących wynikiem przedwczesnej terminacji transkrypcji rośnie. Jedynym kandydatem, co do którego uzyskany wynik może sugerować odwrotną tendencję jest potencjalny ryboprzełącznik regulujący mRNA kodujące podjednostkę D kompleksu antyporterowego. Jednakże różnica w ilości transkryptów skróconych pomiędzy hodowlą kontrolną, a hodowlą z wankomycyną jest na tyle niewielka, że trudno jednoznacznie postawić hipotezę na temat pozytywnej kontroli tego transkryptu ze strony zidentyfikowanego ryboprzełącznika.

W kolejnym kroku wykonałam zestawienie obliczonych współczynników indukcji wybranych kandydatów na ryboprzełączniki. Wskaźnik ten okazał się być najniższy dla podjednostki D kompleksu antyporterowego co uzupełnia poprzednie obserwacje. Aktywność tej jednostki regulatorowej w stresie antybiotykowym wankomycyną o stężeniu 2 mg/l może być wykrywalna, jednakże jest na tyle niska, że uchwycenie sposobu w jaki reguluje ekspresję *mnhF* jest trudne do jednoznacznego określenia i wymaga dalszych analiz. W przypadku pozostałych kandydatów na ryboprzełączniki różnica w ilości transkryptów skróconych na rzecz ich zwiększonej ilości w trakcie stresu antybiotykowego jest wyraźna. Co więcej, wyniki te korelują ze znacznie wcześniejszym etapem doświadczanym. Z uzyskanego obrazu transkryptomu metodą sekwencjonowania Term-seq wyłoniłam sekwencje charakterystyczne dla ryboprzełączników. Podstawą tej selekcji była zwiększona liczba zdarzeń PTT w stresie antybiotykowym. Oznacza to, że moją uwagę zwróciła zwiększona liczba skróconych transkryptów dla warunku w obecności wankomycyny (V+). Przeprowadzona weryfikacja eksperymentalna potwierdza poczynioną obserwację i uzupełnia ją o analizę ilościową wskazanych zdarzeń przedwczesnej terminacji transkrypcji.

Wraz z postępującą ilością wiedzy na temat powstawania oporności na wankomycynę *ab initio* u gronkowca złocistego rozwinięto model mówiący o charakterystycznej sekwencji powstających mutacji. Profil zmian obserwowalny w początkowej fazie adaptacji do wankomycyny odpowiada modelowi VSSA, po którym

następuje hVISA, aż do VISA czyli całkowitej antybiotykooporności. Głównym miejscem działania wankomycyny jest przegroda podziałowa czyli miejsce intensywnej syntezy ściany komórkowej. Antybiotyk swobodnie dyfunduje do końca septum i wiąże się z prekursorami peptydoglikanu, a odległość dyfuzji zmienia się wraz z cyklem komórkowym, gdzie w dalszej części przegroda pogłębia się [178]. Uważa się, że spowolnienie metabolizmu związanego ze ścianą komórkową oraz zmniejszona aktywność autolityczna ogranicza dostęp wankomycyny do miejsca aktywnej syntezy peptydoglikanu. Mechanizm ten jest wspólny dla szczepów hVISA, VISA i jest powszechną, wczesną zmianą fenotypową [179].

W ostatnim czasie mechanizm ten został także potwierdzony u Mu50 [180]. Zidentyfikowane w niniejszej pracy ryboprzełączniki mogą pełnić w komórce rolę mechanizmów regulatorowych uczestniczących w początkowej fazie adaptacji do wankomycyny, a skrócone transkrypty są efektem spowolnienia tempa podziału. Rozpoznane ryboprzełączniki wskazują, które komponenty komórkowe uczestniczą w kaskadzie zdarzeń molekularnych w trakcie procesu uzyskiwania oporności na wankomycynę u gronkowca złocistego. Ryboprzełączniki te stanowią tym samym bardzo atrakcyjne cele molekularne dla alternatywnych terapii przeciwdrobnoustrojowych. Ich wykorzystanie mogłoby pozbawić komórkę początkowych mechanizmów obronnych, dzięki którym bakteria zyskuje czas na rearanżację wewnątrzkomórkową w odpowiedzi na pochodzący ze środowiska zewnętrznego czynnik zagrażający dalszemu rozwojowi. Z innej zaś perspektywy, zgodnie z doniesieniami mówiącymi o braku jednej ścieżki zmian w uzyskiwaniu fenotypu VISA skłania do wniosku, że bakteria znajdzie inny sposób na zapoczątkowanie procesów adaptacyjnych. Jednakże, w uzyskanym obrazie transkryptomu wskazane przeze mnie ryboprzełączniki wyraźnie odcinają się na tle zmian zachodzących w komórce, w trakcie przystosowywania do obecności wankomycyny. Obraz ten wskazuje na zasadność podjęcia dalszych badań w celu pogłębienia obserwacji dotyczącej wskazanych kandydatów na ryboprzełączniki jako krytycznych mechanizmów sieci regulatorowej RNA w ujawnianiu fenotypu VISA u lekoopornej bakterii *Staphylococcus aureus* MRSA.

6. Podsumowanie

Rozwój i rozprzestrzenianie szczepów opornych stanowi realne zagrożenie dla zdrowia wśród ludzi i zwierząt, a ilość efektywnych terapii antybiotykowych kurczy się z każdym kolejnym rokiem. Sięganie po alternatywne metody leczenia w tym kontekście zyskuje na znaczeniu ze względu na pojawianie się nowych niezwykle obiecujących propozycji. Obserwowalny trend w tym obszarze to podejście, w którym nie projektuje się nowych antybiotyków, ale modyfikuje strukturalnie już istniejące związki bakteriobójcze. Kluczowym antybiotykiem w leczeniu zakażeń wywołanych wielolekoopornymi bakteriami Gram-dodatnimi wydaje się być wankomycyna, jednakże zmniejszona wrażliwość na ten antybiotyk, staje się coraz trudniejszą w leczeniu przyczyną zakażeń szpitalnych. Ze względu na ograniczoną dostępność nowych celów bakteryjnych podejmowano różne próby uzyskania pochodnych wankomycyny, które mogłyby ominąć wypracowany mechanizm oporności przy zachowaniu bakteriobójczego działania. Większość strategii koncentruje się na ogólnej idei wprowadzenia ładunków kationowych, a także elementów lipofilowych do struktury wankomycyny, aby celować w błonę komórkową bakterii [181, 182]. Niektóre z przedstawionych modyfikacji dają obiecujące wyniki w przywracaniu zdolności wankomycyny do zwalczania infekcji, jednakże jest im niezbędna dalsza optymalizacja i wykluczenie powstawania nowej oporności.

Zaproponowana tematyka niniejszej rozprawy doktorskiej jest odpowiedzią na potrzebę odkrywania i rozpoznawania nowych celów bakteryjnych w antybiotykoterapii. Mechanizmy regulatorowe RNA jako złożona sieć powiązań umożliwia projektowanie wielu wariantów skutecznej inhibicji ekspresji genów warunkujących lekooporność. Potencjał ryboprzełączników jako nowych celi w antybiotykoterapii jest szczególnie ze względu na fakt, udokumentowanego kontrolowania genów związanych z opornością oraz możliwością indukcji niskocząsteczkowymi metabolitami [183]. W przedstawionej pracy zidentyfikowane zostały potencjalne ryboprzełączniki, których aktywność obserwowalna jest w trakcie adaptacji komórki do stresu wywołanego działaniem wankomycyny.

Zastosowane sekwencjonowanie metodą Term-seq, nastawione na identyfikację zdarzeń terminacji transkrypcji wykazało różnice w długości transkryptów mapujących do regionów niepodlegających transkrypcji 5' pomiędzy warunkami. Obserwacja ta stanowiła podstawę do dalszej analizy pod kątem wyboru kandydatów na

ryboprzełączniki. Selekcja potwierdzona została przez predykcję struktury drugorzędowej, lokalizację oraz funkcję genu znajdującego się pod ich kontrolą. Aktywność typowa dla mechanizmu działania ryboprzełączników została zidentyfikowana w obszarach związanych z transportem komórkowym, metabolizmem DNA, biosyntezą aminokwasów, syntezą białek oraz podziałem komórkowym. Jak wynika z literatury przedmiotu są to obszary zaangażowane w rearanżacje molekularne, prowadzące do zmian fenotypowych komórki w trakcie adaptacji do glikopeptydów. Dalsza weryfikacja eksperymentalna zgodna z opracowaną w naszym zakładzie metodą PTT-quant potwierdziła indukcję wybranych elementów regulatorowych, w hodowlach gdzie stężenie wankomycyny wynosiło 2 mg/l. Zebrane dane stanowią podstawę do wnioskowania na temat istotności wskazanych ryboprzełączników w trakcie procesu uzyskiwania oporności na wankomycynę. Tym samym stanowią potencjalne źródło nowych celów molekularnych w opracowaniu terapii alternatywnych, w przypadkach, gdy metoda konwencjonalna jest nieskuteczna.

Obecnie testowane strategie i ich kombinacje zwiększające potencjał antybiotykowy wankomycyny w celu wyeliminowania szczepów opornych co pokazuje, że proponowane modyfikacje istotnie zwiększają efektywność działania tego glikopeptydu [184]. Wspólnym mianownikiem terapii alternatywnych jest konieczność prowadzenia dalszych badań w odniesieniu do właściwości farmakologicznych, takich jak ich cytotoksyczność i charakterystyka *in vivo*. Działanie to ma na celu poszerzyć arsenał antybiotyków nie tylko, ale w szczególności, przeciwko pojawiającym się bakteriom wielolekoopornym [102]. Dla siedmiu zidentyfikowanych ryboprzełączników w dalszej perspektywie etapem weryfikującym potencjał terapeutyczny byłoby wskazanie klas, do których należą oraz z jakim metabolitem oddziałują. Znajdowanie się pod kontrolą tego samego ligandu stanowiłoby o możliwości jego dodatku do antybiotyku i skutecznym hamowaniu procesów adaptacyjnych na wielu poziomach funkcjonowania komórki bakteryjnej.

7 Wykaz skrótów

3'UTR – region nieulegający translacji 3' (ang. *3' untranslated region*)

5'UTR – region nieulegający translacji 5' (ang. *5' untranslated region*)

70S – rybosom bakteryjny

A – adenozyzna

ABC - białko wiążące ATP (ang. *ATP-binding protein*)

AR - oporność na antybiotyki (ang. *antibiotic resistance*)

A_{260/230} – Stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm i 230 nm

A_{260/280} – Stosunek absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm i 280 nm

CDC – centrum kontroli i zapobiegania chorób (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*)

cDNA – komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

CDP – cytydynodifosforan

ddPCR – emulsyjny PCR w czasie rzeczywistym (ang. *droplet digital PCR*)

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – trifosforan dowolnego deoksyrybonukleotydu

EF-G – czynnik elongacyjny G (ang. *elongation factor G*)

F – starter *forward*

FL – transkrypty pełnej długości (ang. *full-length*)

FMN – mononukleotyd Flawinowy

FOR - częstotliwość występowania oporności (ang. *frequency of resistance*)

GISA – gronkowiec złocisty oporny na glikopeptydy (ang. *glycopeptide –intermediate Staphylococcus aureus*)

GlcN-6-P- glukozamino-6-fosforan

h - helisa

HGT – horyzontalny transfer genów (ang. *horizontal gene transfer*)

HPS_{sa} – czynnik sprzyjający hibernacji u gronkowca złocistego (ang. *hibernation promoting factor Staphylococcus aureus*)

IR – współczynnik indukcji (ang. *induction ratio*)

k/μl – ilość kopii RNA na 1 μl roztworu

L-Lys- L-lizyna (ang. *L-lysine*)

M – marker wielkości

MFS - nadrodzina pomp efluksowych (ang. *major facilitator superfamily*)
MHA – nieselektywny bulion mikrobiologiczny Muellera-Hintona
MIC – minimalne stężenie hamujące (ang. *minimum inhibitory concentration*)
min – minuta
mRNA – RNA matrycowy (ang. *messenger RNA*)
MRSA – gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)
MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo) -2,5-difenylo-tetrazoliowy
Mu50 – szczep gronkowca złocistego o zwiększonej tolerancji na wankomycynę
N₆ – heksamery o losowej sekwencji (ang. *random hexamers*)
NADH - dinuklotyd nikotynoamidoadeninowy
ncRNA- niekodujące RNA (ang. *non-coding RNA*)
NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *new generation sequencing*)
nt – nukleotyd
oligo - oligonukleotyd
OD₆₀₀ – gęstość optyczna mierzona przy długości fali 600 nm (ang. *optical density*)
ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)
PAA – żel poliakryloamidowy
PBP - białko wiążące penicylinę (ang. *penicillin binding protein*)
PBS – domena wiążąca RNA (ang. *primary binding site*)
PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
PQS - szlak sygnały u *P. aeruginosa* (ang. *Pseudomonas quinolone signal*)
R – starter *reverse*
RBS – miejsce wiązania rybosomu (ang. *ribosome-binding site*)
RIN – wskaźnik integralności RNA (ang. *RNA integrity number*)
rcf – względna siła odśrodkowa (ang. *relative centrifugal force*)
RNA – kwas rybonukleinowy
RNAP – polimeraza RNA
rpm – obroty na minutę (ang. *rotations per minute*)
rRNA – rybosomalny RNA (ang. *ribosomal RNA*)
RT – odwrotna transkrypcja (ang. *reverse transcription*)
RT-qPCR – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)
S – startery

SCC*mec*- kasetta chromosomowa u gronkowca złocistego (ang. *Staphylococcal cassette chromosome mec*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SD – sekwencja Shine-Dalgarno

sRNA – małe bakteryjne RNA (ang. *small RNA*)

STK - kinaza seryny/troniny (ang. *serine-threonine kinase*)

S-AdoMet - S-adenozylometionina

T – skrócone transkrypty (ang. *truncated*)

TBE – Tris, kwas borowy, EDTA

TCRS – dwukomponentowy system sygnałowy (ang. *two-component regulatory systems*)

TEC – transkrypcyjny kompleks elongacyjny (ang. *transcription elongation complex*)

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina

T_g – czas generacji

TPP – pirofosforan tiaminy

tRNA – transferowy RNA (ang. *transfer RNA*)

VISA - gronkowiec złocisty odporny na wankomycynę (ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*)

VRSA - gronkowiec złocisty odporny na wankomycynę (ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*)

VSSA - gronkowiec złocisty o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (ang. *vancomycin-susceptible Staphylococcus aureus*)

WHO - Światowa organizacja zdrowia (ang. *World Health Organization*)

8 Spis Tabel, Rysunków i Równań

Tabele

Tabela 1. Zestawienie wybranych genetycznych determinantów oporności na antybiotyki u <i>Staphylococcus aureus</i> . ABC: ATP-binding cassette superfamily; MFS: Major facilitator superfamily.....	21
Tabela 2. Zestawienie cech genomu bakteryjnego <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach.....	41
Tabela 3. Startery i oligomery do sekwencjonowania procedury Term-seq.	43
Tabela 4. Tabela. Startery do metody PTT-quant.....	43
Tabela 5. Oligomery DNA do reakcji cięcia RNazą H.....	44
Tabela 6. Spektrofotometryczna ocena parametrów jakościowych oraz ilościowych całkowitego RNA uzyskanego z <i>S. aureus</i> różnymi metodami. Wartości przedstawione w tabeli są średnią z minimum 4 powtórzeń.....	60
Tabela 7. Kryteria oporności na wankomycynę u <i>Staphylococcus aureus</i> , zgodnie z wytycznymi EUCAST oraz CLSI (ang. Clinical and Laboratory Standards Institute) w latach 2009 – 2022. S – szczep wrażliwy, I- szczep o obniżonej wrażliwości, R – szczep odporny	66
Tabela 8. Czas generacji dla bakterii <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA hodowanych w obecności zróżnicowanego stężenia wankomycyny, od 0 mg/l do 2 mg/l.	67
Tabela 9. Zestawienie informacji o zidentyfikowanych kandydatach na ryboprzełączniki w regionie 5'UTR siedmiu wybranych genów.	81
Tabela 10. Sekwencja zidentyfikowanego regionu dla kandydatów na ryboprzełączniki wykorzystana do predykcji struktury drugorzędowej w programie RNAstructure.	82
Tabela 11. Stężenia transkryptów dla wybranych genów w poszczególnych warunkach hodowli (kontrola oraz w obecności wankomycyny 2 mg/l). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.....	115
Tabela 12. Stężenia transkryptów wybranych genów w poszczególnych warunkach hodowli (V- kontrola, V+ w obecności wankomycyny 2 mg/l). FL- transkrypt ORF, T- transkrypt skrócony, FL+T- suma transkryptów	116

Tabela 13. Zestawienie współczynników indukcji IR poszczególnych transkryptów w próbach poddanych cięciu RNazą H oraz kontroli. 117

Rysunki

Rysunek 1. Krajobraz konformacyjny RNA. Szczególne przykłady konformacji strukturalnej pokazano dla dwóch minimów energetycznych. Różnice pomiędzy strukturami w obrębie jednego minima energetycznego pokazano kolorem fioletowym. 23

Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie fałdowania kotranskrypcyjnego ryboprzełącznika. (1) Fałdowanie wstępne końca 5' RNA podczas transkrypcji. (2) Aptamer ryboprzełącznika może przybierać dwie struktury konformacyjne. (3) Jeden z nich stabilizowany przez wiązanie ligandu. (4) Brak związania ligandu, struktura drugorzędowa podlega dalszym zmianom konformacyjnym wraz z syntezą RNA, RNAP – polimeraza RNA. 24

Rysunek 3. Mechanizmy wiązania ligandu i stabilizacji konformacji ryboprzełącznika. Dopasowanie indukowane zakłada, że zmiana konformacyjna aptameru wynika z wiązania ligandu. W selekcji konformacyjnej wiązanie ligandu stabilizuje dynamicznie zmieniającą się konformację aptameru. 26

Rysunek 4. Schematyczne przedstawienie wewnętrznej terminacji transkrypcji u bakterii. Zatrzymanie polimerazy RNA przez napotkany trakt poliU, po którym następuje utworzenie spinki terminatora w powstającej cząsteczce RNA, powodując destabilizację i dysocjację kompleksu elongacyjnego. 27

Rysunek 5. Regulacja operonu *bgl* u *E.coli*. W przypadku braku β -glukozydów (prawa strona), białko *bglF* fosforyluje i sekwestruje białko *bglG*. Fosforylowane białka nie mogą wiązać miejsca antyterminatora i blokować tworzenie się wewnętrznego terminatora, co można zaobserwować, gdy obecne są β -glukozydy, a białka *bglG* nie są fosforylowane (lewa strona). 30

Rysunek 6. Przykłady regulacji translacji działających w układzie trans. Regulatorowe sRNA kontrolują ekspresję genów pośrednio poprzez odsłonięcie miejsca RBS lub bezpośrednio, poprzez maskowanie regionu RBS. 35

Rysunek 7. Wyniki rozdziału elektroforetycznego w 0,5% żelu agarozowym całkowitego RNA uzyskanego metodami 1, 2, 3, 4, 5, 6 oraz 7. M – marker wielkości, całkowite RNA z I, II oznaczają powtórzenia techniczne. 60

Rysunek 8. Zestawienie parametrów jakościowych dla całkowitego RNA uzyskanego metodami enzymatycznymi (8 i 10), A - elektroforegram dla RNA wyizolowanego metodą nr 8, B wynik rozdziału elektroforetycznego w 0,5% żelu agarozowym RNA uzyskanego metodami 8 oraz 10. I, II, III – powtórzenia techniczne.....	61
Rysunek 9. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA dla wankomycyny na podłożu stałym. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 0 mg/l, 2mg/l, 4 mg/l, 8 mg/l, 16 mg/l oraz 32 mg/l. Linia środkowa dzieląca płytkę wyznacza powtórzenia na płytce, cyfry rzymskie oznaczają powtórzenia pomiędzy płytkami.....	64
Rysunek 10. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA dla wankomycyny na podłożu stałym. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 16 mg/l, 20 mg/l, 22 mg/l oraz 26 mg/l. Linia środkowa dzieląca płytkę wyznacza powtórzenia na płytce, cyfry rzymskie oznaczają powtórzenia pomiędzy płytkami.....	64
Rysunek 11. Wyznaczanie minimalnego stężenia inhibującego u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA dla wankomycyny metodą mikrorozcieńczeń bulionu. Zamieszczone zdjęcia przedstawiają wzrost kolonii na podłożach zawierających kolejno 0,06 mg/l, 0,125 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 0,75 mg/l, 1 mg/l, 1,25 mg/l, 1,5 mg/l, 1,75 mg/l, 2 mg/l, 2,25 mg/l, 2,5 mg/l, 2,75 mg/l, 3 mg/l. W każdym rzędzie najbardziej po lewej stronie, umieszczono jako odnośnik pożywkę bez bakterii.....	65
Rysunek 12. Krzywa wzrostu bakterii <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA dla hodowli prowadzonych w obecności zróżnicowanego stężenia wankomycyny, od 0 mg/l do 2 mg/l.....	68
Rysunek 13. Przeżywalność <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA w warunkach stresu antybiotykowego wankomycyną. Zastosowano antybiotyk w stężeniach 0,0 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l.....	70
Rysunek 14. Charakterystyka zmian aktywności translacyjnej będącej odpowiedzią na stres antybiotykowy metycylinoopornego szczepu <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA. Oś y reprezentuje absorbancję przy długości fali 254 nm, Oś x reprezentuje kierunek gradientu sacharozowego (wzrastające stężenie sacharozy).....	72
Rysunek 15. Procentowa zawartość rybosomów 100S w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA hodowanego w różnych stężeniach wankomycyny.....	73

Rysunek 16. Procentowa zawartość aktywnych translacyjnie polisomów w trakcie logarytmicznej fazy wzrostu u <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA hodowanej w różnych stężeniach wankomycyny.	74
Rysunek 17. Schemat postępowania Term-seq na podstawie publikacji „Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria” autorstwa Daniel Dar i współpracowników [4].	77
Rysunek 18. Analiza biblioteki cDNA dla hodowli kontrolnej z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.....	78
Rysunek 19. Analiza biblioteki cDNA dla hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l z wykorzystaniem analizatora kapilarnego Agilent 2100 Bioanalyzer.	78
Rysunek 20. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika PABCT. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	83
Rysunek 21. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik PABCT znajdującego się w regionie 5' genu kodującego Transporter ABC, białko wiążące ATP. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.	83
Rysunek 22. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika MST. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	84
Rysunek 23. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik MST znajdującego się w regionie 5' genu kodującego cukrowy transporter ABC, białko wiążące ATP. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.....	85
Rysunek 24. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika MCAS. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu	

referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	89
Rysunek 25. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik MCAS znajdującego się w regionie 5' genu kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.....	90
Rysunek 26. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika HSK. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	93
Rysunek 27. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik HSK znajdującego się w regionie 5' genu kodującego kinazę homoseryny. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonych strukturach drugorzędowych.....	94
Rysunek 28. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika ASC. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	97
Rysunek 29. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik ASC znajdującego się w regionie 5' genu kodującego komponent I syntazy kwasu antranilowego. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.....	98
Rysunek 30. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika BA. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	100
Rysunek 31. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik BA znajdującego się w regionie 5' genu kodującego. Na Rysunku zamieszczona została	

legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.	101
Rysunek 32. Odczyty z sekwencjonowania Term-seq. Kolorem czerwonym zaznaczono region potencjalnego Ryboprzełącznika DT. Podłużne linie zielone reprezentują odczyty z hodowli kontrolnej, podłużne linie czerwone reprezentują odczyty z hodowli z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l. Szare prostokąty – zmapowane odczyty do genomu referencyjnego, góra – hodowla kontrolna, dół - hodowla z antybiotykiem. Linia niebieska – referencja.	103
Rysunek 33. Przewidywana struktura drugorzędowa dla kandydata na Ryboprzełącznik DT znajdującego się w regionie 5' genu kodującego transferazę dimetyloadenozynową. Na Rysunku zamieszczona została legenda kolorów, którymi zostały oznaczone nukleotydy na utworzonej strukturze drugorzędowej.....	104
Rysunek 34. Zależność liczby kopii cDNA od odległości od końca 3' transkryptu. Opracowanie własne na podstawie Machtel et al. 2022 [176]. RT- odwrotna transkrypcja, N6- losowe heksamery, startery reakcji odwrotnej transkrypcji.	107
Rysunek 35. Analiza aktywności transkrypcyjnej ryboprzełączników zgodnie z metodą PTT-quant. Opracowanie własne na podstawie Machtel et al. 2022 [176].	108
Rysunek 36. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR po endonukleolitycznym cięciu RNazą H transkryptów izolowanych jako pula RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K ₁ , K ₂ , K ₃ – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.....	109
Rysunek 37. Wynik rozdziału elektroforetycznego produktów PCR po endonukleolitycznym cięciu RNazą H transkryptów izolowanych jako pula RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K ₁ , K ₂ , K ₃ – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym.....	111
Rysunek 38. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego podjednostkę D kompleksu antyporterowego. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K ₁ , K ₂ , K ₃ – produkty	

reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.	113
Rysunek 39. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Transporter ABC, białko wiążące ATP. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.	113
Rysunek 40. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Kinazę homoseryny. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.	114
Rysunek 41. Wynik reakcji ddPCR dla genu kodującego Transferazę dimetyloadenozynową. RNA z hodowli kontrolnej (V-) oraz z wankomycyną o stężeniu 2 mg/l (V+). S1, S2, S3 produkty reakcji po endonukleolitycznym cięciu z RNazą H oraz oligomerem DNA przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3. K1, K2, K3 – produkty reakcji przy wykorzystaniu par starterów 1, 2, 3 na RNA kontrolnym. Krople niebieskie pozytywne, Krople szare negatywne.	114

Równania

Równanie 1. Współczynnik redukcji MTT (MRU ang. <i>MTT reduction unit</i>) . K stopień rozcieńczenia <i>S. aureus</i> pożywką MHA, 200 µl objętość rozcieńczonej hodowli <i>S. aureus</i> , 220 µl całkowita objętość mieszaniny (20619304).	50
Równanie 2. Współczynnik indukcji ryboprzelącznika.	116

9 Referencje

1. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health [Internet]. [cytowane sierpień 2022]. Dostępne na: <https://www.who.int/news/item/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health>
2. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cytowane 25 sierpień 2022];9. Dostępne na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01068>
3. Depardieu, Florence et al. "Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression." *Clinical microbiology reviews* vol. 20,1 (2007): 79-114.
4. Dar, Daniel et al. "Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria." *Science (New York, N.Y.)* vol. 352,6282 (2016)
5. Mulhbacher, Jérôme et al. "Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways." *PLoS pathogens* vol. 6,4 e1000865. 22 Apr. (2010)
6. CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019
7. Richmond, M H. "Some environmental consequences of the use of antibiotics: or 'what goes up must come down'." *The Journal of applied bacteriology* vol. 35,2 (1972): 155- 76.
8. Kuehnert, Matthew J et al. "Methicillin-resistant-Staphylococcus aureus hospitalizations, United States." *Emerging infectious diseases* vol. 11,6 (2005): 868-72.
9. Hiramatsu, K et al. "Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin." *Lancet (London, England)* vol. 350,9092 (1997): 1670-3.
10. Hiramatsu, K et al. "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 40,1 (1997): 135-6.
11. Kuroda, M et al. "Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus." *Lancet (London, England)* vol. 357,9264 (2001): 1225-40.
12. Kato, Yoshihisa et al. "Genetic changes associated with glycopeptide resistance in Staphylococcus aureus: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 65,1 (2010): 37-45.

13. Ohta, Toshiko et al. "Nucleotide substitutions in *Staphylococcus aureus* strains, Mu50, Mu3, and N315." *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* vol. 11,1 (2004): 51-6.
14. Cui, L et al. "Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 44,9 (2000): 2276-85.
15. Hanaki, H et al. "Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 42,3 (1998): 315-20.
16. Hiramatsu, K. "Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance." *The Lancet. Infectious diseases* vol. 1,3 (2001): 147-55.
17. Sieradzki, K, and A Tomasz. "Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* vol. 185,24 (2003): 7103-10.
18. Sieradzki, Krzysztof, and Alexander Tomasz. "Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 50,2 (2006): 527-33.
19. Cui, Longzhu et al. "Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 50,2 (2006): 428-38.
20. McAleese, Fionnuala et al. "Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin." *Journal of bacteriology* vol. 188,3 (2006): 1120-33.
21. Chang, Soju et al. "Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene." *The New England journal of medicine* vol. 348,14 (2003): 1342-7.
22. Gardete, Susana, and Alexander Tomasz. "Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." *The Journal of clinical investigation* vol. 124,7 (2014): 2836- 40.
23. Cohen, S N. "Transposable genetic elements and plasmid evolution." *Nature* vol. 263,5580 (1976): 731-8.

24. Saunders, J R. "Genetics and evolution of antibiotic resistance." *British medical bulletin* vol. 40,1 (1984): 54-60.
25. Projan, Steven J. "(Genome) size matters." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 51,4 (2007): 1133-4.
26. Murphy, E et al. "Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants." *The EMBO journal* vol. 4,12 (1985): 3357-65.
27. Liu, Junyan et al. "Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Microbial pathogenesis* vol. 101 (2016): 56-67.
28. Berg, T et al. "Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids." *Journal of bacteriology* vol. 180,17 (1998): 4350- 9.
29. Chen, Chih-Ming et al. "Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital." *BMC microbiology* vol. 11 98. 12 May. 2011
30. Rouch, D A et al. "Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins." *Molecular microbiology* vol. 4,12 (1990): 2051-62.
31. Nazarov, Pavel A. "MDR Pumps as Crossroads of Resistance: Antibiotics and Bacteriophages." *Antibiotics (Basel, Switzerland)* vol. 11,6 734. 30 May. 2022
32. Papkou, Andrei et al. "Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates." *Nature communications* vol. 11,1 3970. 7 Aug. 2020
33. Liu, Yang et al. "Synergistic activities of an efflux pump inhibitor and iron chelators against *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 54,9 (2010): 3960-3.
34. Liu, Yang et al. "Synergistic activities of an efflux pump inhibitor and iron chelators against *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 54,9 (2010): 3960-3.
35. Truong-Bolduc, Que Chi et al. "NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 50,3 (2006): 1104- 7.
36. Trotonda, María Pilar et al. "MgrA represses biofilm formation in *Staphylococcus aureus*." *Infection and immunity* vol. 76,12 (2008): 5645-54.

37. Darby, Elizabeth M et al. "Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited." *Nature reviews. Microbiology* vol. 21,5 (2023): 280-295.
38. Leontis, N B, and E Westhof. "Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs." *RNA (New York, N.Y.)* vol. 7,4 (2001): 499-512.
39. Westhof, E.; Auffinger, P. *RNA Tertiary Structure*. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Meyer, R.A., Ed.; Wiley: New York, NY, USA, 2006; pp. 5222–5232.
40. Wan, Yue et al. "Understanding the transcriptome through RNA structure." *Nature reviews. Genetics* vol. 12,9 641-55. 18 Aug. 2011
41. Merino, Enrique, and Charles Yanofsky. "Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria." *Trends in genetics : TIG* vol. 21,5 (2005): 260-4.
42. Babitzke, Paul et al. "Regulation of translation initiation by RNA binding proteins." *Annual review of microbiology* vol. 63 (2009): 27-44.
43. Tucker, Brian J, and Ronald R Breaker. "Riboswitches as versatile gene control elements." *Current opinion in structural biology* vol. 15,3 (2005): 342-8.
44. Van Assche, Elke et al. "RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria." *Frontiers in microbiology* vol. 6 141. 3 Mar. 2015
45. Crothers, D M et al. "The molecular mechanism of thermal unfolding of *Escherichia coli* formylmethionine transfer RNA." *Journal of molecular biology* vol. 87,1 (1974): 63- 88.
46. Nowakowski, J.; Tinoco, I. *RNA structure and stability*. *Sem. Virol.* 1997, 8, 153– 165.
47. Russell, Rick et al. "Exploring the folding landscape of a structured RNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 99,1 (2002): 155-60.
48. Dethoff, Elizabeth A et al. "Functional complexity and regulation through RNA dynamics." *Nature* vol. 482,7385 322-30. 15 Feb. 2012
49. Breaker, Ronald R. "Riboswitches and the RNA world." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 4,2 a003566. 1 Feb. 2012
50. Kortmann, Jens et al. "Translation on demand by a simple RNA-based thermosensor." *Nucleic acids research* vol. 39,7 (2011): 2855-68.
51. Schroeder, R.; Grossberger, R.; Pichler, A.; Waldsich, C. *RNA folding in vivo*. *Curr. Opp. Struct. Biol.* 2002, 12, 296–300.

52. Lai, D.; Proctor, J.R.; Meyer, I.M. On the importance of cotranscriptional RNA structure formation. *RNA* 2013, 19, 1461–1473.
53. Liu, K et al. “Role of Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA.” *The EMBO journal* vol. 15,1 (1996): 150-61.
54. Landick, R. “RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition.” *Cell* vol. 88,6 (1997): 741-4.
55. Mooney, R A et al. “Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation.” *Journal of bacteriology* vol. 180,13 (1998): 3265-75.
56. Wickiser, J Kenneth et al. “The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch.” *Molecular cell* vol. 18,1 (2005): 49-60.
57. McCown, Phillip J et al. “Riboswitch diversity and distribution.” *RNA (New York, N.Y.)* vol. 23,7 (2017): 995-1011.
58. Scull, Catherine E et al. “Transcriptional Riboswitches Integrate Timescales for Bacterial Gene Expression Control.” *Frontiers in molecular biosciences* vol. 7 607158. 13 Jan. 2021
59. Gilbert, Sunny D et al. “Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain.” *Journal of molecular biology* vol. 359,3 (2006): 754-68.
60. Roberts, Jeffrey W. “Mechanisms of Bacterial Transcription Termination.” *Journal of molecular biology* vol. 431,20 (2019): 4030-4039.
61. Roberts, Jeffrey W. “Mechanisms of Bacterial Transcription Termination.” *Journal of molecular biology* vol. 431,20 (2019): 4030-4039.
62. Santangelo, Thomas J, and Jeffrey W Roberts. “Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator.” *Molecular cell* vol. 14,1 (2004): 117- 26.
63. Komissarova, Natalia et al. “Shortening of RNA:DNA hybrid in the elongation complex of RNA polymerase is a prerequisite for transcription termination.” *Molecular cell* vol. 10,5 (2002): 1151-62.
64. Epshtein, Vitaly et al. “An allosteric path to transcription termination.” *Molecular cell* vol. 28,6 (2007): 991-1001.
65. Farnham, P J et al. “Effects of NusA protein on transcription termination in the tryptophan operon of Escherichia coli.” *Cell* vol. 29,3 (1982): 945-51.

66. Mondal, Smarajit et al. "NusA-dependent transcription termination prevents misregulation of global gene expression." *Nature microbiology* vol. 1 15007. 11 Jan. 2016
67. Kriner, Michelle A et al. "Learning from the Leaders: Gene Regulation by the Transcription Termination Factor Rho." *Trends in biochemical sciences* vol. 41,8 (2016): 690-699.
68. Hollands, Kerry et al. "Riboswitch control of Rho-dependent transcription termination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109,14 (2012): 5376-81.
69. Kozak, Marilyn. "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." *Gene* vol. 361 (2005): 13-37.
70. Mellin, J R, and Pascale Cossart. "Unexpected versatility in bacterial riboswitches." *Trends in genetics : TIG* vol. 31,3 (2015): 150-6.
71. Turnbough, Charles L Jr. "Regulation of Bacterial Gene Expression by Transcription Attenuation." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* vol. 83,3 e00019-19. 3 Jul. 2019
72. Zhang, Jinwei. "Unboxing the T-box riboswitches-A glimpse into multivalent and multimodal RNA-RNA interactions." *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* vol. 11,6 (2020): e1600
73. Kreuzer, Kiel D, and Tina M Henkin. "The T-Box Riboswitch: tRNA as an Effector to Modulate Gene Regulation." *Microbiology spectrum* vol. 6,4 (2018): 10.1128/microbiolspec.RWR-0028-2018.
74. Samatova, Ekaterina et al. "Translational Control by Ribosome Pausing in Bacteria: How a Non-uniform Pace of Translation Affects Protein Production and Folding." *Frontiers in microbiology* vol. 11 619430. 11 Jan. 2021
75. de Smit, Maarten H, and Jan van Duin. "Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA." *Journal of molecular biology* vol. 331,4 (2003): 737-43.
76. Schlax, Paula Jean, and David J Worhunsy. "Translational repression mechanisms in prokaryotes." *Molecular microbiology* vol. 48,5 (2003): 1157-69.
77. Wieland, Markus, and Jörg S Hartig. "RNA quadruplex-based modulation of gene expression." *Chemistry & biology* vol. 14,7 (2007): 757-63.
78. Russell, Rick et al. "Exploring the folding landscape of a structured RNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 99,1 (2002): 155-60.

79. Chowdhury, Saheli et al. "Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer." *The Journal of biological chemistry* vol. 278,48 (2003): 47915-21.
80. Mondal, Smarajit et al. "NusA-dependent transcription termination prevents misregulation of global gene expression." *Nature microbiology* vol. 1 15007. 11 Jan. 2016
81. Geissmann, Thomas et al. "The role of mRNA structure in translational control in bacteria." *RNA biology* vol. 6,2 (2009): 153-60.
82. Loh, Edmund et al. "A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*." *Cell* vol. 139,4 (2009): 770-9.
83. Waters, Lauren S, and Gisela Storz. "Regulatory RNAs in bacteria." *Cell* vol. 136,4 (2009): 615-28.
84. Breaker, Ronald R. "Riboswitches and Translation Control." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* vol. 10,11 a032797. 1 Nov. 2018
85. Collins, Jennifer A et al. "Mechanism of mRNA destabilization by the glmS ribozyme." *Genes & development* vol. 21,24 (2007): 3356-68.
86. Shao, Xiaolong et al. "RNA G-Quadruplex Structures Mediate Gene Regulation in Bacteria." *mBio* vol. 11,1 e02926-19. 21 Jan. 2020
87. Heidrich, Nadja et al. "In vitro analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA." *Nucleic acids research* vol. 35,13 (2007): 4331-46.
88. Blount, Kenneth F, and Ronald R Breaker. "Riboswitches as antibacterial drug targets." *Nature biotechnology* vol. 24,12 (2006): 1558-64.
89. Munita, Jose M, and Cesar A Arias. "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Microbiology spectrum* vol. 4,2 (2016): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
90. Barrick, Jeffrey E, and Ronald R Breaker. "The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches." *Genome biology* vol. 8,11 (2007): R239.
91. Lee, Elaine R et al. "Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression." *RNA biology* vol. 6,2 (2009): 187- 94.
92. Blount, Kenneth F et al. "Novel riboswitch-binding flavin analog that protects mice against *Clostridium difficile* infection without inhibiting cecal flora." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 59,9 (2015): 5736-46.
93. Johnson, Stuart. "Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches." *International journal of antimicrobial agents* vol. 33 Suppl 1 (2009): S33-6.
94. Howe, John A et al. "Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element." *Nature* vol. 526,7575 (2015): 672-7.

95. Wang, Hao et al. "Dual-Targeting Small-Molecule Inhibitors of the Staphylococcus aureus FMN Riboswitch Disrupt Riboflavin Homeostasis in an Infectious Setting." *Cell chemical biology* vol. 24,5 (2017): 576-588.e6.
96. Zapotoczna, Marta et al. "Mobile-Genetic-Element-Encoded Hypertolerance to Copper Protects Staphylococcus aureus from Killing by Host Phagocytes." *mBio* vol. 9,5 e00550-18. 16 Oct. 2018
97. Oniciuc, Elena-Alexandra et al. "Compositional Analysis of Biofilms Formed by Staphylococcus aureus Isolated from Food Sources." *Frontiers in microbiology* vol. 7 390. 30 Mar. 2016
98. Folliero, Veronica et al. "Evaluation of Antibiotic Resistance and Biofilm Production among Clinical Strain Isolated from Medical Devices." *International journal of microbiology* vol. 2021 9033278. 14 Aug. 2021
99. Jahanshahi, Aidin et al. "Molecular Characterization of Methicillin and Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated from Hospitalized Patients." *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)* vol. 24,10 (2018): 1529-1536.
100. Gründling, Angelika, and Olaf Schneewind. "Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of Staphylococcus aureus." *Journal of bacteriology* vol. 188,7 (2006): 2463-72.
101. Bera, Agnieszka et al. "Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in Staphylococcus aureus." *Journal of bacteriology* vol. 189,1 (2007): 280-3.
102. Mühlberg, Eric et al. "Renaissance of vancomycin: approaches for breaking antibiotic resistance in multidrug-resistant bacteria." *Canadian journal of microbiology* vol. 66,1 (2020): 11-16.
103. Andrews, J M. "Determination of minimum inhibitory concentrations." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* vol. 48 Suppl 1 (2001): 5-16.
104. Jelinkova, Pavlina et al. "Novel vancomycin-peptide conjugate as potent antibacterial agent against vancomycin-resistant Staphylococcus aureus." *Infection and drug resistance* vol. 11 1807-1817. 12 Oct. 2018
105. Ghahremani, Maryam et al. "Emergence of vancomycin-intermediate and -resistant Staphylococcus aureus among methicillin-resistant S. aureus isolated from clinical specimens in the northwest of Iran." *Journal of global antimicrobial resistance* vol. 14 (2018): 4-9.
106. Strona internetowa MIC EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. <https://mic.eucast.org/> Dostęp: wrzesień 2023.

107. Howden, Benjamin P et al. "Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications." *Clinical microbiology reviews* vol. 23,1 (2010): 99-139.
108. Morgan, D M. "Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 79 (1998): 179-83.
109. Hawser, S P et al. "Utility of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class compounds." *Journal of clinical microbiology* vol. 39,7 (2001): 2738-41.
110. De Logu, Alessandro et al. "The 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay as rapid colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in liquid medium." *Clinical laboratory* vol. 49,7-8 (2003): 357-65.
111. Qin, Daoming, and Kurt Fredrick. "Analysis of polysomes from bacteria." *Methods in enzymology* vol. 530 (2013): 159-72.
112. Davis, Amber R et al. "Sequence selectivity of macrolide-induced translational attenuation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,43 (2014): 15379-84.
113. Russell, J B, and G M Cook. "Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions." *Microbiological reviews* vol. 59,1 (1995): 48-62.
114. Kato, Takayuki et al. "Structure of the 100S ribosome in the hibernation stage revealed by electron cryomicroscopy." *Structure (London, England : 1993)* vol. 18,6 (2010): 719-24.
115. Ueta, Masami et al. "Formation of 100S ribosomes in *Staphylococcus aureus* by the hibernation promoting factor homolog SaHPF." *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* vol. 15,1 (2010): 43-58.
116. Yoshida, Hideji, and Akira Wada. "The 100S ribosome: ribosomal hibernation induced by stress." *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* vol. 5,5 (2014): 723-32.
117. Tachon, Sybille et al. "Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*." *Microbiology (Reading, England)* vol. 155,Pt 9 (2009): 2941-2948.

118. Yanofsky, C. "Attenuation in the control of expression of bacterial operons." *Nature* vol. 289,5800 (1981): 751-8.
119. Breaker, Ronald R. "Prospects for riboswitch discovery and analysis." *Molecular cell* vol. 43,6 (2011): 867-79.
120. Weinberg, Zasha et al. "Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes." *Genome biology* vol. 11,3 (2010): R31.
121. Robinson, James T et al. "igv.js: an embeddable JavaScript implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV)." *Bioinformatics (Oxford, England)* vol. 39,1 (2023): btac830.
122. Barrick, Jeffrey E et al. "New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 101,17 (2004): 6421-6.
123. Mandal, Maumita, and Ronald R Breaker. "Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator." *Nature structural & molecular biology* vol. 11,1 (2004): 29-35.
124. Winkler, Wade C, and Ronald R Breaker. "Genetic control by metabolite-binding riboswitches." *Chembiochem : a European journal of chemical biology* vol. 4,10 (2003): 1024-32.
125. Fait, Anaëlle et al. "Adaptive laboratory evolution and independent component analysis disentangle complex vancomycin adaptation trajectories." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 119,30 (2022): e2118262119.
126. Young, J, and I B Holland. "ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1461,2 (1999): 177-200.
127. Basavanna, Shilpa et al. "Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis." *Infection and immunity* vol. 77,8 (2009): 3412-23.
128. Chatterjee, Champak et al. "Biosynthesis and mode of action of lantibiotics." *Chemical reviews* vol. 105,2 (2005): 633-84.
129. Joseph, Pascale et al. "Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* vol. 4,5 (2002): 503-13.

130. Mascher, Thorsten et al. "Cell wall stress responses in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon." *Molecular microbiology* vol. 50,5 (2003): 1591-604.
131. Meehl, Michael et al. "Interaction of the GraRS two-component system with the *VraFG* ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 51,8 (2007): 2679- 89.
132. Cui, Longzhu et al. "DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 49,8 (2005): 3404-13.
133. Wanner, Stefanie et al. "Wall teichoic acids mediate increased virulence in *Staphylococcus aureus*." *Nature microbiology* vol. 2 16257. 23 Jan. 2017
134. Lu, Yunfu et al. "Modulation of MRSA virulence gene expression by the wall teichoic acid enzyme TarO." *Nature communications* vol. 14,1 1594. 22 Mar. 2023
135. Yang, Dengcheng et al. "Functional Mapping of Phenotypic Plasticity of *Staphylococcus aureus* Under Vancomycin Pressure." *Frontiers in microbiology* vol. 12 696730. 9 Sep. 2021
136. Davidson, Amy L et al. "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* vol. 72,2 (2008): 317-64.
137. Boos, W, and H Shuman. "Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation." *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* vol. 62,1 (1998): 204-29.
138. Ilari, Andrea et al. "*Salmonella enterica* serovar Typhimurium growth is inhibited by the concomitant binding of Zn(II) and a pyrrolyl-hydroxamate to ZnuA, the soluble component of the ZnuABC transporter." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1860,3 (2016): 534-41.
139. Shiver, Anthony L et al. "A Chemical-Genomic Screen of Neglected Antibiotics Reveals Illicit Transport of Kasugamycin and Blastidicin S." *PLoS genetics* vol. 12,6 e1006124. 29 Jun. 2016
140. Ho, Hoangdung et al. "Structural basis for dual-mode inhibition of the ABC transporter MsbA." *Nature* vol. 557,7704 (2018): 196-201.

141. Fabrick, Jeffrey A et al. "CRISPR-mediated mutations in the ABC transporter gene ABCA2 confer pink bollworm resistance to Bt toxin Cry2Ab." *Scientific reports* vol. 11,1 10377. 17 May. 2021
142. Ito, M et al. "mrp, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na⁺ and in pH homeostasis." *Journal of bacteriology* vol. 181,8 (1999): 2394-402.
143. Dzioba-Winogrodzki, Judith et al. "The *Vibrio cholerae* Mrp system: cation/proton antiport properties and enhancement of bile salt resistance in a heterologous host." *Journal of molecular microbiology and biotechnology* vol. 16,3-4 (2009): 176-86.
144. Kosono, S et al. "Function of a principal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter, ShaA, is required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*." *Journal of bacteriology* vol. 182,4 (2000): 898-904.
145. Kosono, Saori et al. "Characterization of a multigene-encoded sodium/hydrogen antiporter (sha) from *Pseudomonas aeruginosa*: its involvement in pathogenesis." *Journal of bacteriology* vol. 187,15 (2005): 5242-8.
146. Vaish, Manisha et al. "Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 Antiporters in Salt Tolerance, Alkali Tolerance, and Pathogenesis." *Journal of bacteriology* vol. 200,5 e00611-17. 7 Feb. 2018
147. Ginn, S L et al. "Membrane topology of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter TetA(K) from *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* vol. 179,11 (1997): 3786- 9.
148. Schölmerich, J et al. "Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties--studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles." *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 4,4 (1984): 661-6.
149. Acton, D S et al. "Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact?." *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* vol. 28,2 (2009): 115-27.
150. Squier, Cheryl et al. "Staphylococcus aureus rectal carriage and its association with infections in patients in a surgical intensive care unit and a liver transplant unit." *Infection control and hospital epidemiology* vol. 23,9 (2002): 495-501.
151. Ray, Amy J et al. "Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients." *Clinical infectious*

diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America vol. 37,7 (2003): 875-81.

152. Marks, Laura R et al. "Sensitization of *Staphylococcus aureus* to methicillin and other antibiotics in vitro and in vivo in the presence of HAMLET." *PloS one* vol. 8,5 e63158. 1 May. 2013

153. Gustafson, J et al. "The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon." *Journal of bacteriology* vol. 176,5 (1994): 1460-7.

154. Liebeke, Manuel et al. "A metabolomic view of *Staphylococcus aureus* and its ser/thr kinase and phosphatase deletion mutants: involvement in cell wall biosynthesis." *Chemistry & biology* vol. 17,8 (2010): 820-30.

155. Fridman, Michael et al. "Two unique phosphorylation-driven signaling pathways crosstalk in *Staphylococcus aureus* to modulate the cell-wall charge: Stk1/Stp1 meets GraSR." *Biochemistry* vol. 52,45 (2013): 7975-86.

156. Sun, Fei et al. "Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 109,38 (2012): 15461-6.

157. Donat, Stefanie et al. "Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* vol. 191,13 (2009): 4056-69.

158. Beltramini, Amanda M et al. "Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase." *Infection and immunity* vol. 77,4 (2009): 1406-16.

159. Kant, Sashi et al. "A novel STK1-targeted small-molecule as an "antibiotic resistance breaker" against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*." *Scientific reports* vol. 7,1 5067. 11 Jul. 2017

160. Schaenzer, Adam J et al. "GW779439X and Its Pyrazolopyridazine Derivatives Inhibit the Serine/Threonine Kinase Stk1 and Act As Antibiotic Adjuvants against β -Lactam-Resistant *Staphylococcus aureus*." *ACS infectious diseases* vol. 4,10 (2018): 1508-1518.

161. Proctor, A R, and W E Kloos. "Tryptophan biosynthetic enzymes of *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* vol. 114,1 (1973): 169-77.

162. Farrow, John M 3rd, and Everett C Pesci. "Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal." *Journal of bacteriology* vol. 189,9 (2007): 3425-33.
163. Hwang, Hyeon-Ji et al. "Anthranilate Acts as a Signal to Modulate Biofilm Formation, Virulence, and Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* and Surrounding Bacteria." *Microbiology spectrum* vol. 10,1 (2022): e0146321.
164. Li, Xi-Hui et al. "Anti-biofilm effects of anthranilate on a broad range of bacteria." *Scientific reports* vol. 7,1 8604. 17 Aug. 2017
165. Wendlinger, Günther et al. "Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself." *Microbiology (Reading, England)* vol. 142 (Pt 4) (1996): 985-992.
166. Büttner, Felix Michael et al. "Structure-function analysis of *Staphylococcus aureus* amidase reveals the determinants of peptidoglycan recognition and cleavage." *The Journal of biological chemistry* vol. 289,16 (2014): 11083-11094.
167. Hemmadi, Vijay, and Malabika Biswas. "An overview of moonlighting proteins in *Staphylococcus aureus* infection." *Archives of microbiology* vol. 203,2 (2021): 481-498.
168. Pasztor, Linda et al. "Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins." *The Journal of biological chemistry* vol. 285,47 (2010): 36794-803.
169. Bose, Jeffrey L et al. "Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation." *PloS one* vol. 7,7 (2012): e42244.
170. Kyuma, Tatsuhiko et al. "16S rRNA methyltransferase KsgA contributes to oxidative stress resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*." *Biochimie* vol. 119 (2015): 166-74.
171. O'Farrell, Heather C, and Jason P Rife. "Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* have disparate dependences on KsgA for growth and ribosome biogenesis." *BMC microbiology* vol. 12 244. 24 Oct. 2012
172. Wan, Xiulin et al. "Whole-genome sequence analyses of *Glaesserella parasuis* isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants." *PeerJ* vol. 8 e9293. 22 Jun. 2020
173. Lama, Amrita et al. "Response of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to amicoumacin A." *PloS one* vol. 7,3 (2012): e34037.

174. De Lencastre, H et al. "Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin." *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.) vol. 5,3 (1999): 163-75.
175. Agarwal, Saurabh et al. "Sequencing of first-strand cDNA library reveals full-length transcriptomes." *Nature communications* vol. 6 6002. 21 Jan. 2015
176. Machtel, Piotr et al. "PTT-quant: a new method for direct identification and absolute quantification of premature transcription termination events, following the example of bacterial riboswitches." *Applied microbiology and biotechnology* vol. 106,4 (2022): 1557-1570.
177. Tomsic, Jerneja et al. "Natural variability in S-adenosylmethionine (SAM)-dependent riboswitches: S-box elements in *Bacillus subtilis* exhibit differential sensitivity to SAM In vivo and in vitro." *Journal of bacteriology* vol. 190,3 (2008): 823-33.
178. Pereira, Pedro M et al. "Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 51,10 (2007): 3627-33.
179. Koehl, Jennifer L et al. "Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 48,10 (2004): 3749-57.
180. Utaida, Sugunya et al. "Autolytic properties of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* Mu50." *Antimicrobial agents and chemotherapy* vol. 50,4 (2006): 1541-5.
181. Blaskovich, Mark A T et al. "Protein-inspired antibiotics active against vancomycin- and daptomycin-resistant bacteria." *Nature communications* vol. 9,1 22. 2 Jan. 2018
182. Yarlagadda, Venkateswarlu et al. "Membrane active vancomycin analogues: a strategy to combat bacterial resistance." *Journal of medicinal chemistry* vol. 57,11 (2014): 4558-68.
183. Jia, Xu et al. "Riboswitch control of aminoglycoside antibiotic resistance." *Cell* vol. 152,1-2 (2013): 68-81.
184. Guan, Dongliang et al. "Sulfonium, an Underestimated Moiety for Structural Modification, Alters the Antibacterial Profile of Vancomycin Against Multidrug-Resistant Bacteria." *Angewandte Chemie (International ed. in English)* vol. 58,20 (2019): 6678-6682.

185. Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D, Wang X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *J Microbiol Methods*. 2010 Sep;82(3):330-3.

186. Price-Whelan A, Poon CK, Benson MA, Eidem TT, Roux CM, Boyd JM, Dunman PM, Torres VJ, Krulwich TA. Transcriptional profiling of *Staphylococcus aureus* during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K⁺ uptake systems. *mBio*. 2013 Aug 20;4(4):e00407-13.

187. Costaglioli P, Barthe C, Claverol S, Brözel VS, Perrot M, Crouzet M, Bonneu M, Garbay B, Vilain S. Evidence for the involvement of the anthranilate degradation pathway in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Microbiologyopen*. 2012 Sep;1(3):326-39.

10 Dorobek Naukowy

Publikacja

Chelkowska-Pauszek A, Kosiński JG, **Marciniak K**, Wysocka M, Bąkowska-Żywicka K, Żywicki M. The Role of RNA Secondary Structure in Regulation of Gene Expression in Bacteria. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 22;22(15):7845.

Projekt badawczy

NCN OPUS 13, UMO-2017/25/B/NZ6/00642, wykonawca

Sieci regulatorowe RNA jako nowe cele terapeutyczne w bakteriach lekoopornych.

Kierownik projektu: dr hab. Marek Żywicki

Konferencja

Poster

25th Annual Meeting of the RNA Society, 26 – 31 maj 2020, Vancouver

Microbial weapon against antibiotics - translational activity of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* upon antibiotic stress, Klementyna Marciniak (autor prezentujący), Michał Chodań, Kamilla Bąkowska- Żywicka, Marek Żywicki

Stypedia i nagrody

Stypendium Naukowe współfinansowane przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014 - 2020

Inne osiągnięcia

Brązowy krzyż zasług w działalność naukowo-badawczą. Postanowienie Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 20 maja 2020.

Udział w działalności upowszechniającej i promującej naukę

- a) Noc Biologów, 11 stycznia 2019 r., Poznań – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Biochemika”.
- b) Poznański Festiwal Nauki i Sztuki, 11 kwietnia 2019 r., Poznań – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Biochemika”.
- c) Dzień Dziecka Stowarzyszenia na Rzecz Dzieci Niepełnosprawnych, 2 czerwca 2019 r., Kiszkowo - pokazy dla dzieci w różnym wieku pt. „Bioeksperymenty”.
- d) Rodzinny Piknik Polskiej Akademii Nauk „Nauka też Sztuka!”, 8 czerwca 2019 r, Olszyn - pokazy dla dzieci w różnym wieku pt. „Bioeksperymenty”.
- e) Noc Naukowców, 27 września 2019 – pokazy dla uczniów szkół podstawowych pt. „Kolorowy świat biochemii” oraz „Laboratorium Szalonego Chemika”.
- f) Warsztaty, 31 sierpnia 2020 - warsztaty biochemiczne i pokaz eksperymentów, zwiedzanie laboratoriów CZT dla uczniów szkół podstawowych w ramach akcji charytatywnej dla stowarzyszenia Zupa Na Głównym.
- g) Żywa lekcja biologii, 26 stycznia 2023, we współpracy z Wydziałem Biologii UAM, „Żywa lekcję biologii” dla uczniów klas maturalnych I Liceum Ogólnokształcącego w Gnieźnie: ćwiczenia laboratoryjne, zwiedzanie Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej oraz Zbiorów Przyrodniczych UAM.