



Zakład Biologii Obliczeniowej
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Szkoła Doktorska Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Marta Katarzyna Szustakowska

**Rola struktury drugorzędowej RNA w regulacji translacji w
odpowiedzi na stres antybiotykowy u bakterii
antybiotykoopornych na przykładzie metycylinoopornego szczepu
*Staphylococcus aureus***

The role of RNA secondary structure in the regulation of
translation in response to antibiotic stress in antibiotic-resistant
bacteria on the example of methicillin-resistant *Staphylococcus
aureus*

Praca doktorska przygotowana pod kierunkiem
prof. UAM dr hab. Marka Żywickiego

Poznań, 2025

*Dedykowane mojemu dziadkowi, Januszowi,
Twoja wytrwałość i ciężka praca inspirowały mnie do działania*

PODZIĘKOWANIA

*mojemu promotorowi, prof. UAM dr hab. Markowi Żywickiemu,
za pomoc, wsparcie i gotowość do rozwiązywania pojawiających się problemów*

*Agnieszce, Karolinie, Jankowi, Remigiuszowi i Piotrowi,
za wspólne lata codziennego chaosu, rozmowy i pomoc w najtrudniejszych chwilach
bez Was ta droga nie byłaby tak kolorowa*

*mojemu mężowi, Damianowi,
za cierpliwość, nieocenione wsparcie pod każdym względem
i każdy ugotowany obiad*

*mojej rodzinie,
za każde słowo otuchy i wiary w sukces tego projektu*

*moim przyjaciółom,
za wyrozumiałość i wysłuchiwanie narzekania*

*obu Paniom Dyrektorkom i pracownikom administracyjnym SDNP i WB
za cierpliwość wobec pytań, próśb i wsparcie w sprawach formalnych*

*doktorantom i pracownikom Zakładu Biologii Obliczeniowej,
za wspólnie spędzony czas podczas mojego kształcenia*

*doktorantom pierwszego rocznika Szkoły Doktorskiej Nauk Przyrodniczych UAM,
za wspólne przecieranie szlaków w nowym systemie*

*i sobie
za to, że mimo wszystko nie odpuściłam*

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	6
ŹRÓDŁA FINANSOWANIA	7
DOROBEK PUBLIKACYJNY AUTORA	8
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
1. WSTĘP	12
1.1. BAKTERIE CHOROBOTWÓRCZE – KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA	12
1.2. PIERWSZA LINIA OBRONY W WALCE Z BAKTERIAMI	13
1.2.1. Podział antybiotyków ze względu na strukturę chemiczną	14
1.2.2. Podział antybiotyków ze względu na mechanizm działania	20
1.3. ODPOWIEDŹ BAKTERII NA STOSOWANE LEKI.....	22
1.3.1. Rodzaje antybiotykooporności.....	22
1.3.2. Rozwój oporności wielolekowej na przykładzie <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.4. TRANSLACJA JEDNYM Z PODSTAWOWYCH PROCESÓW W CYKLU ŻYCIA BAKTERII.....	32
1.4.1. Przebieg translacji u bakterii	32
1.4.2. Regulacja poziomu translacji	35
1.4.3. Metody badania poziomu translacji	36
1.5. ROLA STRUKTURY DRUGORZĘDOWEJ RNA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW U BAKTERII.....	39
1.5.1. Dynamika struktury RNA	39
1.5.2. Regulacja translacji indukowana zmianami w strukturze drugorzędowej RNA	40
1.5.3. Ryboprzelączniki i ich potencjał przy tworzeniu nowych terapii antibakteryjnych.....	41
1.5.4. Metody badania struktury drugorzędowej RNA	47
2. CEL ROZPRAWY	49
3. MATERIAŁY I METODY	50
3.1. OPIS UKŁADU EKSPERYMENTALNEGO	50
3.2. SZCZEP BAKTERII	51
3.3. WYKORZYSTANE ANTYBIOTYKI.....	52
3.3.1. Wankomycyna.....	52
3.3.2. Cefoksytyna.....	54
3.4. HODOWLA STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	54
3.5. EKSPERYMENT RIBO-SEQ.....	54
3.6. EKSPERYMENT SHAPE-MAP.....	56
3.7. EKSTRAKCJA RNA.....	57
3.8. OCZYSZCZANIE RNA	58
3.9. WYTRĄCANIE RNA	58
3.10. ANALIZA BIOINFORMATYCZNA	59
3.10.1. Przygotowanie odczytów do analizy.....	59
3.10.2. Mapowanie odczytów do genomu referencyjnego.....	60
3.10.3. Przygotowanie plików do analizy różnicowej	64
3.10.4. Analiza różnicowej ekspresji genów kodujących białka metodą NOISeq	65
3.10.5. Analiza zmienności translacyjnej genów kodujących białka	66
3.10.6. Analiza zmienności efektywności translacji	66
3.10.7. Analiza danych SHAPE-MaP.....	67
3.10.8. Zintegrowana analiza danych strukturalnych i translatomowych	69
3.10.9. Analiza funkcjonalna wybranych genów	70
3.10.10. Wizualizacja wyników	70
4. WYNIKI I DISKUSJA	71
4.1.1. Charakterystyka uzyskanych danych sekwencyjnych	71
4.1.2. Różnicowa ekspresja genów w odpowiedzi na traktowanie antybiotykami.....	80
4.1.3. Badanie poziomu translacji	82
4.1.4. Efektywność translacji	86
4.1.5. Dostępność strukturalna RNA	88
4.1.6. Metoda identyfikacji zmian strukturalnych powiązanych ze zmianami w translacji mRNA	93
4.1.7. Identyfikacja regulatorów translacji opartych o zmiany strukturalne mRNA.....	97
5. PODSUMOWANIE	125
6. BIBLIOGRAFIA	128

Streszczenie

Szybka reakcja bakterii na bodźce środowiskowe ma kluczowe znaczenie dla adaptacji bakterii do nowych warunków. W kontekście bakterii lekoopornych szybkie dostosowanie się bakterii do zmian środowiskowych powoduje, że potrafią one niwelować działanie antybiotyków o wąskim spektrum działania, aktywując mechanizmy regulujące ekspresję odpowiednich genów (McCallum i in. 2010, Craft i in. 2019). Odpowiedź ta jest oparta o liczne mechanizmy, w tym o zdolność zwijania mRNA w alternatywne struktury, które uczestniczą w regulacji m.in. translacji (Geissmann i in. 2009). W efekcie, mechanizmy regulacyjne oparte o RNA, a w szczególności ryboprzełączniki, zyskały w ostatnich latach status potencjalnych celów terapeutycznych, umożliwiając precyzyjne modulowanie ekspresji genów kluczowych dla funkcjonowania bakterii.

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi próbę systemowej analizy tych mechanizmów regulacyjnych u *Staphylococcus aureus* — bakterii Gram-dodatniej, która wykształciła wiele szczepów lekoopornych, w tym MRSA (ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). W badaniach wykorzystano zaawansowane techniki, takie jak SHAPE-MaP (ang. *Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling*) oraz Ribo-seq (profilowanie translacyjne), umożliwiające szczegółowe mapowanie struktury RNA i ocenę aktywności translacyjnej. Analiza porównawcza translatomu przeprowadzona została w warunkach fizjologicznych oraz pod wpływem subletalnych stężeń antybiotyków — wankomycyny i cefoksytyny. Integracja danych strukturalnych z wynikami profilowania rybosomalnego pozwoliła na ilościowe określenie wydajności translacji poszczególnych mRNA oraz ocenę dostępności elementów kluczowych dla inicjacji tego procesu. Opracowana metoda oparta na danych NGS stwarza możliwości szybszej identyfikacji celów terapeutycznych w leczeniu infekcji bakteryjnych. Podejście to umożliwia projektowanie leków oddziałujących na wiele szlaków regulacyjnych jednocześnie, co może zwiększyć skuteczność terapii i ograniczyć rozwój oporności. Taki systemowy model działania, w kontekście rosnącej liczby izolatów MRSA poza środowiskiem szpitalnym (Lakhundi i Zhang 2018), stanowi odpowiedź na jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny.

Abstract

A rapid bacterial response to environmental stimuli is crucial for adaptation to changing conditions. In the context of antibiotic-resistant bacteria, swift adjustment to environmental changes enables them to counteract the effects of narrow-spectrum antibiotics by activating mechanisms that regulate the expression of specific genes (McCallum et al. 2010, Craft et al. 2019). This response relies on multiple regulatory pathways, including the ability of mRNA to fold into alternative structures that influence processes such as translation (Geissmann et al. 2009). As a result, RNA-based regulatory mechanisms — particularly riboswitches — have recently gained recognition as potential therapeutic targets, offering the possibility of precisely modulating the expression of resistance-related genes at the translational level.

This doctoral dissertation presents a systemic analysis of these regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacterium that has developed numerous resistant strains, including MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). The study employs advanced techniques such as SHAPE-MaP (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling) and Ribo-seq (ribosomal profiling), which enable detailed mapping of RNA structure and assessment of translational activity. Comparative analysis of the translome was conducted under physiological conditions and in the presence of sublethal concentrations of antibiotics — vancomycin and ceftiofur. Integration of structural data with ribosome profiling results allowed for quantitative evaluation of mRNA translation efficiency and assessment of the accessibility of key elements involved in translation initiation.

The developed NGS-based approach offers a framework for faster identification of therapeutic targets in the treatment of bacterial infections. This strategy enables the design of drugs that act on multiple regulatory pathways simultaneously, potentially enhancing treatment efficacy and limiting the development of resistance. Such a systemic model of action, considering the growing number of MRSA isolates outside hospital settings (Lakhundi & Zhang 2018), addresses one of the most pressing challenges in modern medicine.

ŹRÓDŁA FINANSOWANIA

Niniejsza praca powstała przy wsparciu finansowym Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS nr. 13 2017/25/B/NZ6/00642 pt. „Sieci regulatorowe RNA jako nowe cele terapeutyczne w bakteriach lekoopornych”

DOROBEK PUBLIKACYJNY AUTORA

1. Chełkowska-Pauszek, A., Kosiński, J. G., Marciniak, K., Wysocka, M., Bąkowska-Żywicka, K., & Żywicki, M. (2021). The role of RNA secondary structure in regulation of gene expression in bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7845.
2. Głazinska, P., Kulasek, M., Glinkowski, W., Wysocka, M., & Kosiński, J. G. (2020). LuluDB—The database created based on small RNA, transcriptome, and degradome sequencing shows the wide landscape of non-coding and coding RNA in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) flowers and pods. *Frontiers in Genetics*, 11, 455.

*artykuły opublikowane pod nazwiskiem panięskim autorki: Wysocka

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

5' UTR	- <i>ang. 5' untranslated region</i> , rejon 5' nieulegający translacji
aa-tRNA	- aminoacylo-tRNA
AdoCbl	- adenozylokobalamina
BND	- <i>ang. penicillin-binding domain</i> , domena wiążąca penicylinę
c-di-GMP	- <i>ang. cyclic bis-(3',5')-dimeric guanosine monophosphate</i> , cykliczny diguanozynomonofosforan
CA-MRSA	- <i>ang. community acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , oporny na metycylinę szczep gronkowca złocistego związany z infekcjami pozaszpitalnymi
cDNA	- <i>ang. complementary DNA</i> , DNA komplementarne
CPM	- <i>ang. counts per million of reads</i> , zliczenia na milion odczytów
DMS	- <i>ang. dimethyl sulfate</i> , siarczan dimetylu
DNA	- <i>ang. deoxyribonucleic acid</i> , kwas deoksyrybonukleinowy
EF	- <i>ang. elongation factor</i> czynnik elongacyjny
ESBL	- <i>ang. extended-spectrum β-lactamase</i> , β -laktamaza o rozszerzonym spektrum działania
ESKAPE	- akronim określający grupę sześciu bakterii szczególnie niebezpiecznych pod względem infekcji i oporności wielolekowej: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
FC	- <i>ang. fold change</i> , krotności zmiany
FMN	- mononukleotyd flawinowy
FRET	- <i>ang. Förster Resonance Energy Transfer</i> , rezonansowy transfer energii Förstera
G4	- G-kwadrupleks
GI	- <i>ang. genomic island</i> , wyspa genomowa
GISA	- <i>ang. glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty o pośredniej wrażliwości na glikopeptydy
GO	- <i>ang. Gene Ontology</i> , ontologia genów
GTP	- guanozynotrójfosforan
HA-MRSA	- <i>ang. hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , szpitalny szczep gronkowca złocistego oporny na metycylinę
HCA-MRSA	- <i>ang. health care-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , oporny na metycylinę szczep gronkowca złocistego związany z opieką zdrowotną
HTG	- <i>ang. horizontal gene transfer</i> , horyzontalny transfer genów
IC	- <i>ang. initiation complex</i> , kompleks inicjacyjny

IFs	- ang. <i>initiation factors</i> czynniki inicjujące translację
LA-MRSA	- ang. <i>livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , s oporny na metycylinę szczep gronkowca złocistego występujący u zwierząt hodowlanych
LPS	- lipopolisacharyd
MD	- ang. <i>Mean-Difference</i> , wykres porównujący średnią oraz różnicę w ekspresji genów
MDR	- ang. <i>multidrug resistance efflux pumps</i> , pompy wypływowe warunkujące oporności na wiele leków
MODSA	- ang. <i>modified penicillin-binding protein Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty ze zmodyfikowanym białkiem wiążącym penicylinę
MprF	- ang. <i>multiple peptide resistance factor</i> , czynnik oporności na wiele peptydów
MRLM	- ang. <i>methicillin-resistant lacking mec</i> , gronkowiec złocisty oporny na metycylinę niezależnie od genu <i>mecA/mecC</i>
mRNA	- ang. <i>messenger RNA</i> , matrycowy RNA
MRSA	- ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty oporny na metycylinę
MRSE	- ang. <i>methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> oporny na metycylinę
MSSA	- ang. <i>methicillin-susceptible/sensitive Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty wrażliwy na metycylinę
ncRNA	- ang. <i>non-coding RNA</i> , niekodujący RNA
NGS	- ang. <i>next-generation sequencing</i> , sekwencjonowanie nowej generacji
ORF	- ang. <i>open reading frame</i> , otwarta ramka odczytu
PABA	- ang. <i>para-aminobenzoic acid</i> , kwas p-aminobenzoesowy
PARS	- ang. <i>parallel analysis of RNA</i> , równoległa analiza RNA
PBP	- ang. <i>penicillin-binding protein</i> , białko wiążące penicylinę
PCA	- ang. <i>principal component analysis</i> , analiza głównych składowych
PIC	- ang. <i>pre-initiation complex</i> , kompleks preinicjacyjny
PRP	- ang. <i>pentapeptide repeat protein</i> , białko z powtórzeniami pięciopeptydowymi
RBP	- ang. <i>RNA-binding protein</i> , białko wiążące RNA
RBS	- ang. <i>ribosome binding site</i> , miejsce wiązania rybosomu
rG4	- ang. <i>RNA Guanine-quadruplex</i> , kwadrupleks guaninowy w RNA
RMS	- ang. „ <i>red man</i> ” <i>syndrome</i> , syndrom czerwonego człowieka (alternatywnie: syndrom czerwonej szyi)
RNA	- ang. <i>ribonucleic acid</i> , kwas rybonukleinowy
RPFs	- ang. <i>ribosome-protected fragments</i> , mRNA chronione przez rybosomy
RRF	- ang. <i>ribosome recycling factor</i> , czynnik recyklingu rybosomu

rRNA	- <i>ang. ribosomal RNA</i> , rybosomalny RNA
RT	- <i>ang. reverse transcription</i> , odwrotna transkrypcja
SAH	- S-adenozylhomocysteina
SAM	- S-adenozylometionina
SCCmec	- <i>ang. staphylococcal chromosomal cassette mec</i> , gronkowcowa kasetta chromosomowa
SD	- sekwencja Shine-Dalgarno
SHAPE-MaP	- <i>ang. Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling</i> , selektywne acylacje 2'-hydroksyli analizowane przez wydłużanie startera i profilowanie mutacji
sRNA	- <i>ang. small RNA</i> , małe RNA
SSU	- <i>ang. small subunit</i> , mała podjednostka rybosomu
TE	- <i>ang. Ttranslation efficiency</i> , efektywność translacji
THF	- tetrahydrofolian
TMM	- <i>ang. Ttrimmed mean of M-values</i> , odcięta średnia wartości M
TPP	- pirofosforan tiaminy
tRNA	- <i>ang. transfer RNA</i> , transferowy RNA
uORF	- <i>ang. upstream open reading frame</i> , otwarta ramka odczytu znajdująca się powyżej właściwej ramki odczytu
VRE	- <i>ang. vancomycin-resistant enterococci</i> , enterokoki odporne na wankomycynę
VRSA	- <i>ang. vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i> , gronkowiec złocisty odporny na wankomycynę
VSE	- <i>ang. vancomycin-susceptible enterococci</i> , enterokoki wrażliwe na wankomycynę

1. WSTĘP

1.1. Bakterie chorobotwórcze – krótka charakterystyka

Pierwsze wzmianki o bakteriach pojawiły się drugiej połowie XIX wieku, jednak dopiero w 1974 roku zostały one formalnie oddzielone od królestwa roślin, tworząc odrębne królestwo organizmów prokariotycznych. Początkowo klasyfikacja bakterii opierała się na barwieniu metodą Grama, morfologii oraz zapotrzebowaniu na tlen. Z czasem została wzbogacona o taksonomię numeryczną i chemotaksonomię, uwzględniające również podobieństwo fenetyczne i molekularne. Przełomem w klasyfikacji bakterii były badania porównawcze nad sekwencjami podjednostek rybosomalnych, które na przełomie lat 70. i 80. XX wieku umożliwiły bardziej precyzyjny podział taksonomiczny oraz określenie związków filogenetycznych w obrębie królestwa bakterii. Kluczowe różnice pomiędzy bakteriami można określić na podstawie składu zasad DNA, obecności lipidów lub kwasów tłuszczowych, rodzaju syntetyzowanych chinonów, wzoru cytochromowego oraz składu i struktury ściany komórkowej. Ściana komórkowa bakterii pełni wielofunkcyjną rolę ochronną i regulacyjną - stanowi pierwszą barierę fizyczną wobec niekorzystnych warunków środowiskowych, a jednocześnie działa jako sensor zmian fizykochemicznych otoczenia, uczestnicząc w przekazywaniu sygnałów adaptacyjnych. Dzięki swojej porowatej strukturze i obecność wyspecjalizowanych kanałów transportowych, umożliwia selektywny transport cząsteczek do i z wnętrza komórki, zachowując równowagę pomiędzy stabilnością strukturalną a dostępnością molekularną. Peptydoglikan, inaczej nazywany mureiną, jest jedynym polimerem budującym ścianę komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Składa się z nici glikanowych połączonych krótkimi peptydami, zawierającymi reszty N-acetyloglukozaminy i N-acetylmuraminianu, połączone wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Część peptydowa, przyłączona do N-acetylmuraminianu, zawiera zarówno L-, jak i D-aminokwasy, i to właśnie w jej budowie występują największe różnice między typami bakterii. Zarówno podjednostki peptydowe (peptydy rdzeniowe), jak i mostki międzypeptydowe mogą różnić się składem i strukturą pierwszorzędową. Synteza peptydoglikano u bakterii zachodzi z udziałem białek wiążących penicylinę (PBP, *ang. penicillin-binding protein*), takich jak transglikozylazy oraz transpeptydazy. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich charakteryzuje się grubą, pojedynczą warstwą peptydoglikanu, która stanowi ponad 30% jej składu. Oprócz peptydoglikanu zawierają kwasy tejchojowe lub teichuronowe oraz

białka błonowe (działające jak sensory i kanały transportowe) oraz kapsularne polisacharydy. Ich błona cytoplazmatyczna wewnętrzna ściśle przylega do warstwy peptydoglikanu, a brak błony zewnętrznej sprawia, że są bardziej podatne na działanie niektórych antybiotyków (Schleifer 2009). Dzięki grubej warstwie peptydoglikanu bakterie Gram-dodatnie zatrzymują fiolet krystaliczny podczas barwienia metodą Grama, co pozwala na ich łatwą identyfikację. Ich ściana komórkowa zawiera również białka błonowe pełniące funkcje sensoryczne i transportowe oraz kapsularne polisacharydy (Jubeh i in. 2020). Z kolei bakterie Gram-ujemne posiadają bardziej złożoną, wielowarstwową ścianę komórkową, zawierającą przede wszystkim lipopolisacharydy, fosfolipidy, lipoproteiny, w której peptydoglikan stanowi jedynie około 10% masy. Znajduje się on pomiędzy błoną cytoplazmatyczną a błoną zewnętrzną, zbudowaną z dwuwarstwy fosfolipidowej (Schleifer 2009; Haddad i in. 2024). Ze względu na obecność błony zewnętrznej bakterie Gram-ujemne są mniej podatne na działanie wielu antybiotyków i trudniejsze do barwienia metodą Grama (Blair i in. 2015; Jubeh i in. 2020). Lipidy odgrywają kluczową rolę w budowie błon komórkowych zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Fosfolipidy składają się z hydrofilowej głowy (glicerol z grupą fosforanową oraz choliną lub etanoloaminą) oraz dwóch hydrofobowych łańcuchów kwasów tłuszczowych, które odpychają wodę (Haddad i in. 2024).

1.2. Pierwsza linia obrony w walce z bakteriami

Antybiotyki są związkami, które hamują rozwój mikroorganizmów lub są dla nich śmiertelne. Mogą one być substancjami naturalnie produkowanymi przez mikroorganizmy bądź pozyskiwanymi syntetycznie. Przeznaczone są głównie do zwalczania infekcji bakteryjnych u ludzi oraz zwierząt poprzez zahamowanie rozwoju mikroorganizmów. Choć antybiotyki skutecznie eliminują patogenne mikroorganizmy, nie wykazują toksyczności wobec organizmu gospodarza. Niemniej jednak, ich działanie nie ogranicza się wyłącznie do drobnoustrojów chorobotwórczych — mogą również niszczyć korzystną mikroflorę, zwłaszcza tę zasiedlającą jelita (Elders i in. 2020). Istnieje kilka sposobów klasyfikacji antybiotyków m.in. w zależności od ich struktury molekularnej, sposobu działania czy organizmu, na który oddziałują. Większość systemów opiera się na strukturze chemicznej oraz sposobie oddziaływania, który dzieli się na bakteriobójczy oraz bakteriostatyczny. Środki bakteriobójcze zabijają bakterie, w przeciwieństwie do środków bakteriostatycznych, które hamują ich wzrost i namnażanie ułatwiając działanie systemowi

immunologicznemu. Mechanizmy działania antybiotyków obejmują m.in. przerwanie syntezy białek, dezintegrację kwasów nukleinowych czy uszkodzenie błon bakteryjnych (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024). Antybiotyki należące do tej samej klasy strukturalnej wykazują podobną toksyczność i efekty działania (Etebu & Ariekpar 2016). Leki te przyczyniły się do spadku śmiertelności wśród dzieci, wydłużeniu życia i są nieodłącznym elementem operacji chirurgicznych oraz chemioterapii (Blair i in. 2015).

1.2.1. Podział antybiotyków ze względu na strukturę chemiczną

Pierwszy podział antybiotyków ze względu na strukturę obejmował antybiotyki beta-laktamowe i nie beta-laktamowe. Obecnie wyróżnić można dziewięć grup strukturalnych: beta-laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, chinolony, fosfomycyny, polimyksyny, sulfonamidy, tetracykliny oraz glikopeptydy (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Antybiotyki beta-laktamowe

Większość znanych antybiotyków należy do grupy beta-laktamowych, które charakteryzują się obecnością czterech wiązań β -laktamowych w pierścieniu składającym się z trzech atomów węgla i jednego atomu azotu. Zaliczają się do nich penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy oraz monobaktamy. Penicyliny posiadają dodatkowe podklasy, wśród których wyróżnia się: penicyliny naturalne, penicyliny odporne na penicylinazę, aminopenicyliny, penicyliny o działaniu przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* i penicyliny o rozszerzonym spektrum działania. Wszystkie antybiotyki beta-laktamowe ingerują w proces syntezy ściany komórkowej bakterii prowadząc do jej rozpadu i śmierci organizmu, poprzez wiązanie się z białkami wiążącymi penicylinę (PBP, ang. *Penicillin-binding protein*). Działanie antybiotyków β -laktamowych może być wzmacniane przez substancje hamujące β -laktamazy — enzymy bakteryjne odpowiedzialne za rozkład wiązań β -laktamowych. Dzięki ich zastosowaniu bakterie stają się bardziej wrażliwe na terapię. Do takich inhibitorów należą tazobaktam, kwas klawulanowy oraz sulbaktam (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Penicylina jest pierwszym odkrytym i opisanym antybiotykiem i należy do grupy beta-laktamowców nazwanej od jej nazwy **penicylinami**. Zaliczane są do niej penicylina G, penicylina V, oksacylina (dikloksacylina), metycylina, nafcylina, ampicylina, amoksycylina, karbenicylina, piperacylina, mezlocylina i tykarcylina. W swojej strukturze

mają rdzeń składający się z pierścienia kwasu 6-aminopenicylanowego oraz innych łańcuchów bocznych. Prekursorem tej grupy, jak i wszystkich antybiotyków jest penicylina G, która została wyizolowana z grzyba *Penicillium notatum*. Obecnie jej źródłem jest inny gatunek, a mianowicie *Penicillium chrysogenum*. Pomimo tego, że sama penicylina ma dosyć wąski zakres działania inne antybiotyki z tej grupy takie jak ampicylina, karbenicylina czy amoksycylina w swojej strukturze posiadają dodatkowe boczne łańcuchy, dzięki którym antybiotyki unikają działania β -laktamaz oraz są zdolne do przemieszczania się przez zewnętrzną błonę ściany komórkowej bakterii (Etebu & Ariekpar 2016). Naturalne penicyliny są skuteczne w zwalczaniu tlenowych bakterii Gram-dodatnich, takich jak streptokoki, enterokoki oraz wybrane szczepy gronkowców niewytwarzających enzymu β -laktamazy. Syntetyczne odmiany penicylin oraz te o rozszerzonym spektrum działania, umożliwiają leczenie infekcji wywołanych przez niektóre bakterie Gram-ujemne, jak *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* czy *Escherichia coli*, o ile nie wykazują one oporności (Miller 2002).

Rdzeniem kolejnej grupy antybiotyków beta-laktamowych, czyli **cefalosporyn**, jest kwas 7-aminocefalosporanowy z dodatkowymi łańcuchami bocznymi zawierającymi pierścienie 3,6-dihydro-2 H-1,3-tiazanowe, które umożliwiają im wiązanie się z PBP, omijanie bariery krew-mózg, oporność na działanie penicylinaz oraz jonizację ułatwiającą wnikanie do komórek bakterii Gram-ujemnych. Wyróżnia się pięć generacji tych antybiotyków, z czego każda kolejna była bardziej efektywna w bakteriach Gram-ujemnych a ich pierwszy izolat pozyskany został z grzyba *Cephalosporium acremonium* (Etebu & Ariekpar 2016).

Na tle innych grup antybiotyków beta-laktamowych **monobaktamy** wyróżniają się pod względem strukturalnym. Ich pierścień nie jest związany z innymi bocznymi łańcuchami czy pierścieniami – stąd słowo mono w nazwie. Jedynym reprezentantem tej grupy na rynku komercyjnym jest Aztreonam, który działa jedynie na aerobowe bakterie Gram-ujemne (Etebu & Ariekpar 2016).

Ostatnią wyróżnioną podklasą antybiotyków beta-laktamowych są **karbapenemy**. Stosowane są one w walce z bakteriami, które poprzez syntezę enzymów niwelujących działanie antybiotyków beta-laktamowych zyskiwały na nie oporność. Ta podklasa antybiotyków opiera się właściwościom hydrolitycznym beta-laktamaz i ma szeroki zakres

działania zarówno wśród bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Pierwszym karbapenemem była tienamycyna, a innymi przykładami są też imipenem, meropenem i ertapenem (Etebu & Ariekpar 2016).

Makrolidy

Antybiotyki należące do tej klasy charakteryzują się 14-, 15- lub 16-członowymi makrocyklicznymi pierścieniami laktozy z przyłączonymi deoksycukrami L-kladynożą i D-dezozoaminą. Pierwotnie wyizolowane zostały z bakterii *Streptomyces* i należą do największej grupy naturalnych antybiotyków, jednakże produkuje się je także na drodze półsyntezy. Sposobem działania makrolidów jest hamowanie procesu syntezy białek, zarówno jako środki bakteriobójcze jak i bakteriostatyczne. Wiążą się z podjednostką rybosomalną 50S uniemożliwiając dalsze wydłużanie łańcuchów polipeptydowych. Do tej grupy należy erytromycyna, azytromycyna i klarytromycyna. Makrolidy mają szersze spektrum działania niż penicyliny a także stanowią alternatywę dla pacjentów uczulonych na penicylinę (Etebu & Ariekpar 2016). Wykorzystuje się je w leczeniu pozaszpitalnego zapalenia płuc oraz ostrego zaostrzenia przewlekłego zapalenia oskrzeli i są aktywne wobec *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* oraz gatunkach *Legionella*. Nowe makrolidy, takie jak azytromycyna, wykorzystuje się także w przypadku chorób przenoszonych drogą płciową o podłożu bakteryjnym (*Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*) (Retsema & Fu 2001).

Tetracykliny

Antybiotyki tej klasy w swojej strukturze mają cztery pierścienie węglowodorowe. Pierwszym naturalnym przedstawicielem pozyskanym na drodze fermentacji promieniowców była chlorotetracyklina (aureomycyna). Ze względu na metodę pozyskiwania tych związków wyróżnia się ich różne generacje. Pierwsza generacja to tetracykliny powstałe w wyniku biosyntezy, czyli tetracyklina, chlorotetecyklina, oksytetracyklina i demeklocyklina, druga generacja to takie, które są powstają na drodze półsyntezy na przykład doksy cyklina, lymecyklina, meclocyklina, metacyklina, minocyklina i rolitetracyklina, natomiast trzecia generacja produkowana jest w pełni syntetycznie m.in. tygecyklina. Podobnie jak makrolidy, tetracykliny oddziałują na proces translacji uniemożliwiając przyłączanie kolejnych aminokwasów do łańcuchów polipeptydów (Etebu & Ariekpar 2016). Łączą się z podjednostką rybosomalną 30S blokując możliwość doprowadzenia aminoacylo tRNA do odpowiedniego miejsca na

rybosomie. Ich działanie zazwyczaj jest bakteriostatyczne, jednakże opisano także przypadki ich aktywności bakteriobójczej. Spektrum działania obejmuje szerokie grono zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych (Grossman 2016).

Chinolony

Antybiotyki te odkryte zostały jako środki antymalaryczne, których pierwowzorem była chinina, a ich pierwszym reprezentantem był kwas nalidyksowy. Wyróżnia się dwie główne grupy, chinolony i naftyrydony, w których znajdują się m.in.: cynoksacyna, norfloksacyna, ofloksacyna, cyproksacyna, temafloksacyna, sparfloksacyna czy enoksacyna. Ich podstawowa struktura składa się z dwóch pierścieni, jednakże w najnowszej generacji dodany został jeszcze jeden pierścień, który poszerza spektrum działania tych antybiotyków o bakterie anaerobowe. Ingerują one w proces replikacji DNA i transkrypcji u bakterii. (Etebu & Ariekpar 2016). Chinolony wykazują działanie przeciwbakteryjne poprzez bezpośrednią ingerencję w proces replikacji DNA bakterii. Ich głównym celem molekularnym są topoizomerazy typu II — przede wszystkim gyraza DNA oraz topoizomeraza IV — enzymy odpowiedzialne za utrzymanie struktury i funkcjonalności nici DNA podczas replikacji, transkrypcji oraz rozdzielania zreplikowanych chromosomów. Enzymy te umożliwiają prawidłowe kopiowanie materiału genetycznego oraz jego segregację do komórek potomnych. Chinolony zakłócają ten proces, co prowadzi do zatrzymania replikacji i ostatecznie do śmierci komórki bakteryjnej (Fàbrega i in. 2009). Chinolony mają szerokie spektrum działania zarówno wśród bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych a ich aktywność wobec poszczególnych gatunków zmieniała się wraz z rozwojem coraz nowszych reprezentantów tej grupy. Chinolony można podzielić na cztery zasadnicze grupy pod względem zakresu działania i zastosowania klinicznego. Pierwsza obejmuje starsze substancje wykorzystywane głównie w leczeniu zakażeń układu moczowego — są one skuteczne wobec typowych bakterii Gram-ujemnych, przede wszystkim wobec bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Druga grupa to leki o działaniu ogólnoustrojowym, takie jak cyprofloksacyna czy lewofloksacyna, które wykazują wysoką aktywność przeciwko drobnoustrojom Gram-ujemnym, w tym *Pseudomonas aeruginosa*, ale ich skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich jest ograniczona. Trzecia kategoria obejmuje związki o szerokim spektrum działania, zdolne zwalczać zarówno bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie, beztlenowe, jak i *P. aeruginosa*. Czwarta grupa to chinolony ukierunkowane na infekcje dróg oddechowych — skuteczne wobec *Streptococcus pneumoniae* oraz patogenów atypowych, choć mniej efektywne przeciwko *P. aeruginosa*.

Niektóre z nich, jak moksyflokscyna, wykazują dodatkową aktywność wobec bakterii beztlenowych (Andersson & MacGowan 2003).

Aminoglikozydy

Te związki pozyskiwane są z bakterii glebowych *Actinomycetes* należących do rodzajów *Streptomyces* oraz *Micromonospora* i składają się z 3-aminocukrów połączonych wiązaniami glikozydowymi. Pierwszym przedstawicielem tej klasy była streptomycyna, wyizolowana w 1943 roku ze szczepu *Streptomyces griseus*, która okazała się być wysoce toksyczna dla ludzi. Zsyntetyzowano mniej toksyczne związki o podobnych właściwościach, którymi są gentamycyna, neomycyna, tobramycyna i amikacyna. Podobnie do makrolidów i tetracyklin hamują one syntezę białka poprzez wiązanie z podjednostką rybosomalną (Etebu & Ariekpar 2016). Do wiązania dochodzi w miejscu A podjednostki 30S co prowadzi do inkorporacji nieadekwatnych tRNA i utworzenia nieprawidłowych białek w efekcie pozbawiając bakterie kluczowych elementów szlaków metabolicznych. Wszyscy przedstawiciele tej grupy wykazują aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, niektórym bakteriom Gram-dodatnim oraz *Pseudomonas* spp (Becker & Cooper 2013).

Sulfonamidy

Antybiotyki te swoją nazwę zawdzięczają obecnością grupy sulfonamidowej w swojej strukturze i należą do grupy antybiotyków syntetycznych (Etebu & Ariekpar 2016; Ovung & Bhattacharyya 2021). Sulfonamidy wykazują szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, obejmujące przede wszystkim bakterie Gram-dodatnie oraz wybrane Gram-ujemne, takie jak *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* czy *Enterobacter* spp. Jednocześnie nie wykazują aktywności wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia* spp (Ovung & Bhattacharyya 2021). Sulfonamidy działają poprzez hamowanie syntezy kwasu foliowego w komórkach bakteryjnych, który jest niezbędny do produkcji DNA. Ich struktura przypomina kwas p-aminobenzoowy (PABA), naturalny substrat w szlaku syntezy folianów. Dzięki temu sulfonamidy konkurencyjnie wiążą się z enzymem syntetazą dihydropteroanową, zastępując PABA i blokując dalsze etapy syntezy — w tym powstawanie dihydrofolianu i tetrahydrofolianu. Brak tetrahydrofolianu uniemożliwia syntezę DNA, co prowadzi do zahamowania wzrostu i podziału komórek bakteryjnych. W efekcie sulfonamidy hamują namnażanie bakterii, dlatego określa się je jako bakteriostatyczne. Dodatkowo, w terapii często łączy się je z trimetoprimem, który blokuje

kolejny enzym — reduktazę dihydrofolianową — co jeszcze skuteczniej zatrzymuje produkcję tetrahydrofolianu i replikację DNA. Ich toksyczne działanie może także wywoływać skutki uboczne u leczonych pacjentów, ponieważ zaburzenia w produkcji tetrahydrofolianu mogą prowadzić do niedoboru grup metylowych niezbędnych do prawidłowej metylacji DNA. Taki mechanizm może potencjalnie wpływać na komórki gospodarza, prowadząc do nieprawidłowości w syntezie DNA, a nawet zwiększonego ryzyka karcynogenezy (Etebu & Arikekpar 2016; Ovung & Bhattacharyya 2021).

Glikopeptydy

Grupa tych antybiotyków działa głównie na bakterie Gram-dodatnie poprzez hamowanie syntezy ściany komórkowej. Ich mechanizm polega na wiązaniu końca dipeptydowego D-Ala-D-Ala prekursorów peptydoglikanu, co blokuje kluczowe reakcje transpeptydacji i transglikozylacji, niezbędne do zbudowania warstwy peptydoglikanowej w ścianie komórkowej. Skutkuje to skutkuje zatrzymaniem syntezy peptydoglikanu i osłabieniem struktury ściany komórkowej, prowadząc do destabilizacji struktury komórkowej i śmierci bakterii. Naturalne glikopeptydy, takie jak wankomycyna i teikoplanina, są produkowane przez promieniowce i charakteryzują się obecnością aromatycznych aminokwasów oraz glikozyłowanych reszt. Wykazują one aktywność wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* oraz enterokoków wrażliwych na wankomycynę. Półsyntetyczne pochodne, m.in. oritawancyna, telawancyna i dalbawancyna, zostały zmodyfikowane o dodatkowe grupy hydrofobowe, co zwiększa ich zdolność zakotwiczenia w błonie i rozszerza spektrum działania, obejmując *Clostridium difficile*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*, a także szczepy odporne, takie jak MRSA, odporny na wankomycynę *S. aureus* (VRSA, ang. *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*), odporne na wankomycynę enterokoki (VRE, ang. *vancomycin-resistant enterococci*) oraz szczepy wrażliwe, jakie jak wrażliwy na metycylinę *S. aureus* (MSSA, ang. *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*), wrażliwe na wankomycynę enterokoki (VSE, ang. *vancomycin-susceptible enterococci*). Niektóre z nich wykazują również dodatkowe działanie depolaryzacyjne na błonę komórkową, co wzmacnia ich aktywność przeciwbakteryjną (Binda i in. 2014)

Oksazolidynony

Jest to najnowsza ze wspomnianych tu klas antybiotyków. Ich sposób działania nie jest dokładnie opisany jednak ingerują one w proces syntezy białek u bakterii poprzez wiązanie miejsca P w 50S podjednostce rybosomu. Mają szeroki zakres działania przeciwko bakteriom Gram-dodatnim w tym: metycylino- i wankomycynoopornych streptokokom, wankomycynoopornych enterokokom, penicylinoopornych pneumokokom oraz bakteriom beztlenowym. Pierwszym antybiotykiem tej klasy był linezolid (Etebu & Ariekpar 2016).

1.2.2. Podział antybiotyków ze względu na mechanizm działania

Ze względu na efekt działania antybiotyków wyróżnia się antybiotyki bakteriobójcze np.: penicylina, cefalosporyny, fluorochinolony i aminoglikozydy oraz środki bakteriobójcze, do których należą m.in.: tetracyklina, klindamycyna i metronidazol. Wśród mechanizmów działania antybiotyków wyróżnia się inhibicję syntezy ściany komórkowej, zakłócenie struktury lub funkcjonowania błony komórkowej, inhibicję syntezy białek, inhibicję funkcjonowania i syntezy kwasów nukleinowych a także blokowanie kluczowych ścieżek metabolicznych. Każda z klas antybiotyków oddziałuje na bakterie w jeden lub więcej sposobów (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Inhibicja syntezy ściany komórkowej

Antybiotyki beta-laktamowe takie jak penicyliny, karbapenemy i cefalosporyny blokują możliwość tworzenia wiązań peptydowych a co za tym idzie powodują przerwanie sieci peptydoglikanów co osłabia całą strukturę ściany komórkową bakterii. Skutkuje to wzmożoną autolizę w organizmach Gram-dodatnich, natomiast w bakteriach Gram-ujemnych powoduje to reakcję przeciwzapalną. Glikopeptydy także oddziałują na ścianę komórkową bakterii, te antybiotyki jednak uniemożliwiają utworzenie wiązań w warstwie peptydoklikanowej wiążąc się z cząsteczkami peptydoglikanu, a co za tym idzie blokują uformowanie stabilnej struktury ściany komórkowej (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Inhibitory funkcjonowania błony komórkowej

Klasy antybiotyków uszkadzających błony komórkowe bakterii działają selektywnie na różne grupy drobnoustrojów, ponieważ ich błony zawierają odmienne lipidy. Daptomycyna wykorzystuje obecność wapnia, aby zainicjować depolaryzację błony

komórkowej, co prowadzi do zahamowania syntezy makrocząsteczek i jej destabilizacji. Polimyksyny, natomiast, wywołują rozpad błony bakteryjnej poprzez silne wiązanie się z lipidową częścią lipopolisacharydu, co skutecznie niszczy strukturę komórkową patogenów (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Inhibitory syntezy białek/translacji

Do tej grupy zaliczanych jest najwięcej klas antybiotyków. Można je podzielić na te, które inhibują jednostki 50S oraz te, które są inhibitorami jednostek 30S. Przedstawicielami pierwszej grupy są m.in.: erytromycyna, klindamycyna, linkomycyna, chloramfenikol czy linezolid. Działają one poprzez blokowanie inicjacji translacji lub fazy wydłużania łańcuchów aminokwasowych. Inicjację translacji zakłócają np. oksazolidynony a w proces elongacji ingerują przedstawiciele makrolidów np. linkozamid i streptogramina. Antybiotyki z grupy drugiej, blokującej działanie podjednostek 30S, uniemożliwiają rybosomom dostęp do aminoacylo-tRNA. Ten mechanizm działania występuje w przypadku m.in.: tetracykliny, streptomycyny lub spektynomycyny. Antybiotyki również zaburzają proces translacji, uniemożliwiając prawidłowe funkcjonowanie miejsc A (aminoacylo-tRNA), P (peptydylo-tRNA) oraz E (wyjściowego). Dodatkowo mogą wpływać na etap dekodowania mRNA w rybosomie, który jest katalizowany przez jego podjednostki 30S i/lub 50S. Bakteriostatyczne antybiotyki działają na hamowanie translacji na etapie elongacji lub terminacji, natomiast środki bakteriobójcze blokują jej inicjację. Wśród antybiotyków wykorzystujących te mechanizmy działania, jedynie aminoglikozydy są podklasą, która jest szeroko bakteriobójcza. Pozostałe, makrolidy, streptograminy, spektynomycyna, tetracykliny i chloramfenikol działają zazwyczaj bakteriostatycznie, jednak opisano przypadki, w których np. chloramfenikol w sprzyjających warunkach działa także bakteriobójczo na niektóre gatunki bakterii (Etebu & Ariekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Inhibitory syntezy kwasów nukleinowych

Antybiotyki, które ingerują w syntezę kwasów nukleinowych działają poprzez blokowanie replikacji lub wstrzymanie transkrypcji. Przykładem antybiotyków o tym mechanizmie działania są chinolony, które zakłócają działanie enzymu rozplatającego podwójną helisę DNA, helikazy, co skutkuje zahamowaniem procesu replikacji kwasu deoksyrybonukleinowego. Innym mechanizmem działania tej klasy antybiotyków jest zaburzenie pracy polimerazy RNA co wstrzymuje jego transkrypcję. Chinolony, których

celem jest polimeraza RNA nie ingerują w działanie ludzkiej polimerazy RNA, co czyni je specyficznymi w walce z bakteriami (Etebu & Arikekpar 2016; Haddad i in. 2024).

Antymetabolity

Sulfonamidy i trimetoprim wykazują strukturę naśladującą substraty kluczowe dla metabolizmu komórkowego bakterii, co prowadzi do ich konkurencyjnego wiązania przez enzymy bakteryjne zamiast właściwych cząsteczek. Mechanizm ten zakłóca istotne procesy biochemiczne mikroorganizmów. Sulfonamidy działają jako analogi tetrahydrofolianu, który odgrywa zasadniczą rolę w syntezie kwasu foliowego, niezbędnego dla metabolizmu kwasów nukleinowych i aminokwasów. W wyniku tego procesu dochodzi do zaburzenia produkcji DNA i RNA, co prowadzi do zahamowania wzrostu i podziału komórek bakteryjnych. Ten mechanizm czyni sulfonamidy skutecznymi środkami przeciwbakteryjnymi, wykorzystującymi strategię blokowania szlaków metabolicznych poprzez strukturalne podobieństwo do naturalnych substratów. Innymi istotnymi procesami metabolicznymi, które są celem dla antybiotyków są m.in.: biosynteza izoprenoidów czy kwasów tłuszczowych (Etebu & Arikekpar 2016; Haddad i in. 2024).

1.3. Odpowiedź bakterii na stosowane leki

W reakcji na stosowanie antybiotyków bakterie rozwinęły mechanizmy obronne, neutralizujące ich działanie, które mogą być przekazywane pomiędzy bakteriami nie tylko w mutacjach genowych, ale także na zasadzie horyzontalnego transferu genów (HTG), chociażby z udziałem plazmidów i innych elementów pozagenomowych. Dynamiczne przystosowywanie się bakterii do kolejnych strategii terapeutycznych prowadzi do ciągłej ewolucji oporności, utrudniającej skuteczne zwalczanie zakażeń przy użyciu dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych (Blair i in. 2015).

1.3.1. Rodzaje antybiotykooporności

Mechanizmy antybiotykooporności, które bakterie mogą pozyskać, można podzielić na trzy grupy. Pierwszą z nich stanowi kontrola wewnątrzkomórkowego stężenia antybiotyku, realizowana poprzez aktywne wypompowywanie cząsteczek leku z komórki lub ograniczenie ich napływu przez zmiany w strukturze błon. Drugą grupę stanowią modyfikacje miejsc docelowych działania antybiotyków — bakterie mogą zmieniać strukturę celów molekularnych, co utrudnia wiązanie leku bez utraty funkcji biologicznej.

Trzeci mechanizm polega na bezpośredniej modyfikacji samego antybiotyku, co uniemożliwia jego działanie terapeutyczne. Współwystępowanie tych strategii znacząco utrudnia skuteczne leczenie zakażeń i sprzyja rozwojowi oporności wielolekowej (Blair i in. 2015).

1.3.1.1. Kontrola wewnątrzkomórkowego stężenia antybiotyku

Pierwszy z mechanizmów oparty jest o minimalizowanie wewnątrzkomórkowego stężenia antybiotyku poprzez obniżanie jego wnikania do wnętrza bakterii lub jego aktywnego usuwanie. Ze względu na budowę, bakterie Gram-ujemne wykazują naturalnie niższą przepuszczalność dla wielu antybiotyków w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich. Wynika to z obecności błony zewnętrznej, która stanowi barierę ograniczającą przenikanie substancji do wnętrza komórki. Hydrofilowe antybiotyki mogą przechodzić przez tę warstwę jedynie poprzez dyfuzję przez kanały błonowe. Jednym ze sposobów, w jaki bakterie Gram-ujemne rozwijają oporność na antybiotyki, jest zmniejszenie ekspresji kanałów błonowych lub ich zastąpienie bardziej selektywnymi kanałami transportowymi. Dzięki temu ograniczają wnikanie leków do wnętrza komórki, co znacząco obniża ich skuteczność. Przykładowo u bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* i *Acinetobacter spp.* redukcja ilości kanałów błonowych znacząco przyczynia się do oporności na karbapenemy i cefalosporyny co utrudnia leczenie zakażeń i wzmacnia ich rozwój.

Innym mechanizmem zmniejszania stężenia antybiotyku wewnątrz bakterii jest jego aktywne usuwanie za pomocą tzw. pomp wypływowych (*ang. efflux pumps*). Te systemy transportowe skutecznie eliminują liczne substancje przeciwbakteryjne, przyczyniając się do odporności u bakterii Gram-ujemnych. Niektóre pompy mają wysoką specyficzność substratową, podczas gdy inne mogą usuwać szeroką gamę substancji o różnej strukturze chemicznej. Te, które przyczyniają się do oporności na wiele leków (MDR – *ang. multidrug resistance efflux pumps*) stanowią poważne zagrożenie w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Geny kodujące pompy są powszechnie obecne u bakterii na w chromosomowym DNA, jednak niektóre z nich ulegają ekspresji z mobilnych elementów genomowych jak plazmidy, które są transferowalne pomiędzy komórkami, umożliwiając szybkie rozprzestrzenianie mechanizmów oporności wśród patogenów klinicznych. Transkrypcja genów kodujących pompy jest kontrolowana przez regulatory lokalne, które są kodowane bezpośrednio obok tych genów, oraz regulatory globalne, które wpływają na wiele procesów komórkowych. Wysoki poziom ekspresji genów tych kanałów obserwowany u

bakterii opornych na wiele antybiotyków często wynika z mutacji w obrębie genów należących do sieci regulującej ich transkrypcję. Wzrost ekspresji pomp odpływowych może również nastąpić wskutek indukcji w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, szczególnie w warunkach wymagających aktywnego usuwania szkodliwych substancji z komórki bakteryjnej. Bakterie o nadmiernej ekspresji pomp efluksowych, w tym *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*, były identyfikowane u pacjentów już od lat 90. XX wieku. Mechanizm aktywnego usuwania antybiotyków przez pompy odpływowe stanowi jedno z najważniejszych wyzwań w terapii zakażeń bakteryjnych. Nadmierna ekspresja tych struktur transportowych, mutacje regulacyjne oraz możliwość horyzontalnego transferu genów oporności na plazmidach czynią mechanizm aktywnego usuwania antybiotyków jednym z kluczowych czynników przyspieszających rozwój antybiotykooporności w populacjach bakteryjnych (Blair i in. 2015).

1.3.1.2. Modyfikacje miejsc docelowych dla antybiotyków

Mechanizm drugiej grupy antybiotykoopornych bakterii polega na genetycznych mutacjach lub potranslacyjnych modyfikacjach miejsc docelowych dla antybiotyków. Zmiany w strukturze celu, które uniemożliwiają efektywne wiązanie antybiotyku, przy jednoczesnym zachowaniu jego pierwotnej funkcji biologicznej, mogą prowadzić do rozwoju oporności. Niektóre geny kodujące cele antybiotyków występują w wielu kopiach. Przykładem jest linezolid – pierwszy oksazolidynonowy antybiotyk. Działa on na podjednostkę 23S rRNA rybosomu bakterii Gram-dodatnich, której geny występują w wielu identycznych kopiach. W trakcie leczenia mutacja w jednej z tych kopii prowadzi do wyselekcjonowania opornych szczepów *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*, a następnie do częstych rekombinacji między homologicznymi allelami, co szybko sprzyja dominacji mutanta w populacji bakteryjnej.

Kolejnym przykładem jest mechanizm oporności na polimyksyny, które są cyklicznymi peptydami o hydrofobowych ogonach. Związki te skutecznie działają na bakterie Gram-ujemne poprzez wiązanie się z lipopolisacharydem (LPS) błony zewnętrznej i destabilizację obu błon komórkowych. Najczęstszym mechanizmem oporności jest modyfikacja struktury lipidu A, kluczowego składnika LPS, co prowadzi do obniżenia powinowactwa polimyksyn do błony komórkowej bakterii. Zmiany w strukturze błony komórkowej bakterii są także mechanizmem opornościowym na działanie daptomycyny w *Staphylococcus aureus*. Daptomycyna działa na bakterie Gram-dodatnie,

zakłócając strukturę ich błony cytoplazmatycznej poprzez wiązanie z anionowymi fosfolipidami i w obecności jonów wapnia wnika do błony, powodując jej depolaryzację co prowadzi do śmierci komórki. Oporność na daptomycynę u *S. aureus* wynika z mutacji w genie *mprF* kodującym czynnik oporności na wiele peptydów (MprF, *ang. multiple peptide resistance factor*), która prowadzi do zmian w strukturze błony komórkowej, zmniejszając skuteczność wiązania antybiotyku (Blair i in. 2015). Mutacja w genie *mprF* prowadzi do nasilonej lizynylacji fosfatydyloglicerolu, co skutkuje zwiększoną produkcją dodatnio naładowanego lizynofosfatydyloglicerolu, który jest następnie przemieszczany przez domenę flipazy MprF na zewnętrzną warstwę błony komórkowej, zwiększając jej dodatni ładunek powierzchniowy i tworząc barierę elektrostatyczną, która ogranicza wiązanie daptomycyny i sprzyja oporności (Thitiananpakorn i in. 2020).

Innym przykładem nabycia oporności jest suplementacja celu antybiotyku poprzez nabycie genu homologicznego do pierwotnego celu. W przypadku metycylinoopornego *Staphylococcus aureus* (MRSA) mechanizm ten polega na przysposobieniu genu *mecA* kodującego białko niewrażliwe na β -laktamy, które umożliwia syntezę ściany komórkowej pomimo zahamowania aktywności natywnego odpowiednika tego białka.

Bakterie w odpowiedzi na antybiotyki wykorzystują także mechanizmy epigenetyczne. Przykładem jest metylacja cząsteczki 16S rRNA, która uniemożliwia wiązanie i działanie makrolidów, linkozamidów i streptogramin lub obecność metylotransferazy warunkującej oporność na fenikole, pleuromutiliny, streptograminy, linkozamidy i oksazolidynony poprzez metylację 23S rRNA. Także oporność na aminoglikozydy warunkowana jest metylacją rybosomu, który stanowi miejsce docelowe dla tej grupy antybiotyków. Jednym ze sposobów oporności na chinolony jest modyfikacja miejsca docelowego działania leku — enzymów topoizomerazy IV i gyrazy DNA. Geny *qnr*, kodują białka (PRP, *ang. pentapeptide repeat proteins*), które wiążą się z tymi enzymami. PRP oddziałują z kompleksem enzym–lek już po związaniu chinolonu, ułatwiając jego odłączenie, dzięki temu enzymy odzyskują aktywność i mogą kontynuować ligację DNA (Blair i in. 2015).

1.3.1.3. Modyfikacja antybiotyków przez bakterie

Bakterie mogą również niszczyć lub modyfikować antybiotyki, przeciwdziałając ich skuteczności. Zidentyfikowano tysiące enzymów, które potrafią rozkładać i modyfikować antybiotyki różnych klas, w tym β -laktamy, aminoglikozydy, fenikole i makrolidy. Niektóre z tych enzymów mają szerokie spektrum działania i mogą neutralizować różne antybiotyki w obrębie tej samej klasy. W przypadku β -laktamów, takich jak penicyliny,

cefalosporyny, klawaminy, karbapenemy i monobaktamy, ich rozkład jest przeprowadzany przez β -laktamazy, których zakres aktywności ewoluował wraz z pojawieniem się nowych antybiotyków o ulepszonych właściwościach. Początkowe β -laktamazy, skuteczne przeciwko antybiotekom pierwszej generacji, zostały zastąpione przez β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBLs, ang. *extended-spectrum β -lactamases*), które neutralizują oksymino-cefalosporyny. Wzrost liczby bakterii przenoszących geny ESBLs spowodował wzrost klinicznego zastosowania karbapenemów, co z kolei przyczyniło się do pojawienia się karbapenemaz – enzymów o rozszerzonym spektrum działania zdolnych do hydrolizy zarówno karbapenemów, jak i cefalosporyn. Z kolei obecność różnorodnych ESBLs oraz karbapenemaz doprowadziła do powstania szczepów opornych na wszystkie antybiotyki β -laktamowe, stanowiących poważne wyzwanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Bakterie wykorzystują enzymy także w celu zmniejszenia powinowactwa antybiotyku do jego celu poprzez dodanie dodatkowych grup chemicznych do struktury leku. Transferowane mogą być różne grupy, m.in.: acylowa, fosforanowa, nukleotydylowa i rybitoilowa. Przykładem tak zwalczanych antybiotyków są aminoglikozydy. Są one podatne na modyfikacje enzymatyczne, ponieważ ich duże cząsteczki zawierają odsłonięte, liczne grupy hydroksylowe i amidowe, co czyni je celem dla enzymów bakteryjnych. Wyróżnia się trzy główne klasy enzymów modyfikujących aminoglikozydy: acetylotransferazy, fosfotransferazy i nukleotydylotransferazy (Blair i in. 2015).

*1.3.2. Rozwój oporności wielolekowej na przykładzie *Staphylococcus aureus**

Na podstawie aktualnych danych opublikowanych przez Naghavi i współautorów w *The Lancet* (2024) szacuje się, że w 2021 roku na świecie co roku ponad 1 milion osób umiera bezpośrednio wskutek infekcji wywołanych przez antybiotykooporne drobnoustroje, a ponad 4,7 miliona zgonów pozostaje z nimi związanych pośrednio. Na przestrzeni trzech dekad największy globalny wzrost liczby zgonów — zarówno przypisywanych bezpośrednio oporności bakterii, jak i związanych z tą opornością — zaobserwowano w przypadku szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę: od ~261 000 zgonów związanych z opornością i ~57 200 zgonów przypisywanych bezpośrednio MRSA w 1990 roku, do odpowiednio ~550 000 i ~130 000 zgonów w roku 2021 (Naghavi i in. 2024). Co więcej, mimo pogłębiającej się skali oporności, rozwój nowych antybiotyków o odmiennym mechanizmie działania pozostaje znacząco

ograniczony, co dodatkowo komplikuje skuteczną terapię infekcji w warunkach klinicznych (Blair i in. 2015). Najbardziej znanym mechanizmem wymiany genów pomiędzy bakteriami, który pozwala im na szybkie zmiany genomu jest horyzontalny transfer genów (HGT, *ang. horizontal gene transfer*). Geny związane z antybiotykoopornością są zazwyczaj kodowane u bakterii na mobilnych elementach genetycznych – plazmidach, które bakterie mogą wymieniać pomiędzy sobą (Palmer i in. 2010).

Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest Gram-dodatnią bakterią typu *Firmicutes*, rodzaju *Staphylococcus* i klasy *Bacilli* (Lee i in. 2018). Bakteria ta u ludzi występuje najczęściej na skórze oraz błonie śluzowej w jamie nosowo-gardłowej i powszechnie przyczynia się do rozwoju zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych (Palmer i in. 2010; Lakhundi & Zhang 2018). Jest jednym z reprezentantów grupy ESKAPE, czyli grupy bakterii najistotniejszych pod względem infekcji i oporności wielolekowej. *S. aureus* dzięki świetnemu dostosowaniu do warunków środowiskowych wytworzył oporność na niemal wszystkie używane antybiotyki (Tabela 1) (Mlynarczyk-Bonikowska i in. 2022). W środowisku szpitalnym nabywanie antybiotykooporności zachodzi zdecydowanie szybciej ze względu na wzmożoną ekspozycję bakterii na konkretne antybiotyki, stymulującą przyspieszoną selekcję szczepów opornych. Jednym z najczęściej spotykanych jest szczep *S. aureus* oporny na metycylinę, którego infekcje mogą prowadzić do poważnych powikłań, a nawet śmierci zarażonego (McCallum i in. 2010; Lakhundi & Zhang 2018; Craft i in. 2019).

Tabela 1. Antybiotykooporne szczepy gronkowca złocistego (Lakhundi & Zhang 2018; Mlynarczyk-Bonikowska i in. 2022).

Linia	Opis
MRSA	<i>ang. methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> – gronkowiec złocisty oporny na wszystkie antybiotyki β -laktamowe
HA-MRSA (HCA-MRSA)	<i>ang. hospital-acquired MRSA</i> – szpitalny MRSA, później nazwę rozszerzono do MRSA związanych z opieką zdrowotną (<i>ang. health care-associated MRSA</i>)

CA-MRSA	szczep MRSA związany z infekcjami poza szpitalnymi (<i>ang. community acquired</i>) - oporność na mniejszą liczbę antybiotyków spoza grupy β -laktamów niż HA-MRSA
LA-MRSA	<i>ang. livestock-associated MRSA</i> – występujący u zwierząt hodowlanych
VISA / VRSA	<i>ang. vancomycin intermediate S. aureus</i> – szczep o pośredniej wrażliwości na wankomycynę, który następnie został sklasyfikowany jako gronkowiec złocisty oporny na wankomycynę (<i>ang. vancomycin-resistant S. aureus</i>)
GISA	<i>ang. glycopeptide intermediate S. aureus</i> – szczep o pośredniej wrażliwości na glikopeptydy

1.3.2.1. Rozwój antybiotykoopornych szczepów gronkowca złocistego

Antybiotykooporność gronkowca złocistego sięga lat 60-tych, kiedy po raz pierwszy opisano linię gronkowca złocistego opornego na metycylinę. Szczep ten oporny jest na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, a dzięki obecności transferowalnych wysp genomowych zyskał także oporność na aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, streptograminy B i tetracykliny. W latach 70-tych i 80-tych do walki z MRSA wykorzystano cefalosporyny, co skutkowało rozwojem szczepów opornych także na te leki. Wankomycyna przez długi czas stanowiła podstawowy środek terapeutyczny, a w przypadkach szczególnie trudnych była stosowana jako lek ostatniej szansy w leczeniu ciężkich infekcji wywołanych przez szczepy MRSA. Ze względu na szerokie spektrum działania wobec *Staphylococcus aureus* opornego na metycylinę, wykorzystywana była zarówno w leczeniu empirycznym, jak i jako terapia celowana. Pod koniec XX wieku pojawiły się szczepy pośrednio odporne na wankomycynę (VISA) oraz glikopeptydy (GISA), z czego VISA aktualnie klasyfikowany jest już jako szczep oporny na wankomycynę, pierwszy raz opisany w na początku XXI wieku. W 2006 roku po raz pierwszy wykryto w gronkowcach integrony klasy I, które wcześniej były znane jedynie w bakteriach Gram-ujemnych. W tych integronach opisano kasety genowe, które determinują oporność na różne antybiotyki: streptomycynę (*aadA2*, *aadA5*), chloramfenikol (*cmlA1*) i trimetoprim (*dfrA12*, *dfr17*) (Lakhundi & Zhang 2018; Mlynarczyk-Bonikowska i in. 2022). Z dostępnych badań wynika, że kolonizacja zwierząt gospodarskich

i towarzyszących przez *Staphylococcus aureus* może stanowić źródło transmisji patogenu do człowieka. Zjawisko to ma istotne znaczenie epidemiologiczne, ponieważ potwierdza możliwość międzygatunkowego przenoszenia szczepów bakteryjnych — w tym również tych wykazujących oporność na antybiotyki. Zwierzęta mogą pełnić rolę rezerwuarów *S. aureus*, co prowadzi do rozszerzenia puli genów oporności w populacjach poza szpitalnych i zwiększa ryzyko infekcji trudnych w leczeniu zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (Lakhundi & Zhang 2018).

1.3.2.2. Charakterystyka szczepu MRSA

Pierwsze wzmianki o szczepie gronkowca złocistego opornego na metycylinę pojawiły się w latach 60-tych XX wieku, krótko po tym jak wprowadzono ten antybiotyk do użytku. Szczep ten szybko i globalnie stał się jedną z najbardziej powszechnych przyczyn szpitalnych infekcji bakteryjnych. Zakażenie MRSA pacjenci przechodzą w sposób zróżnicowany, od bezobjawowych infekcji górnych dróg oddechowych po wysoce inwazyjne zapalenia kończące się śmiertelnie. Metycylina należy do grupy półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych a jej działanie polega na blokowaniu aktywności enzymatycznej białek wiążących penicylinę (PBP) odpowiedzialnych za formowanie stabilnej warstwy peptydoglikanowej w ścianie komórkowej bakterii. Mechanizm, który niweluje działanie metycyliny opiera się na produkcji dodatkowego białka PBP2, które strukturalnie i funkcjonalnie odpowiada PBP. Swoją oporność na metycylinę oraz większość antybiotyków β -laktamowych, gronkowiec złocisty zawdzięcza transferowalnej wyspie genomowej (GI, *ang. genomic island*) - gronkowcowej kasecie chromosomowej SCCmec (*ang. staphylococcal chromosomal cassette mec*) kodującej geny *mecA* i *mecC*, pozyskanej w wyniku horyzontalnego transferu genów. Wyspy te zawierają wiele mobilnych elementów genomowych dzięki temu szczep ten z łatwością zyskuje także oporność na inne klasy antybiotyków co czyni go bardziej niebezpiecznym, zwłaszcza w środowiskach wysokiej presji selekcyjnej za strony antybiotyków, jak szpitale.

Wyróżnia się wiele klonów *S. aureus*, czyli szczepów, które są na tyle do siebie podobne, że istnieje prawdopodobieństwo, że rozwinęły się z tego samego przodka. Część z nich jest charakterystyczna dla konkretnego położenia geograficznego stąd wyróżnia się między innymi klony europejskie, afrykańskie, amerykańskie czy azjatyckie. Uważa się, że istnieją przynajmniej dwie możliwe drogi rozprzestrzeniania MRSA, poprzez przenoszenie obecnych, opornych klonów lub poprzez pozyskiwanie wspomnianej już kasety

chromosomowej SCCmec przez szczep wrażliwy na metycylinę MSSA. Oporność na metycylinę uzyskiwały zarówno patogeny ludzkie jak i zwierzęce. Podstawowym obszarem kolonizacji gronkowca jest jama nosowa, jednak dobrze też rozwija się w gardle oraz kroczu. Do krwi przenikać może poprzez rany lub podczas zabiegów medycznych naruszających ciągłość skóry. W porównaniu do innych bakterii kolonizujących nos *S. aureus* nie potrzebuje dużej ilości substancji odżywczych do przeżycia, przez co jest lepiej przystosowany do namnażania w tym środowisku. Gronkowiec złocisty posiada dużo czynników wirulencji, które często znajdują się na ruchomych elementach genomu, skutkując znaczącą zmiennością pomiędzy liniami, klonami czy szczepami (Lee i in. 2018; Lakhundi & Zhang 2018; Craft i in. 2019; Młynarczyk-Bonikowska i in. 2022).

1.3.2.3. Mechanizmy antybiotykoodporności *S. aureus*

Oporność na antybiotyki beta-laktamowe

Szczepy bakterii MRSA są odporne na prawie wszystkie beta-laktamowe antybiotyki, z wyjątkiem dwóch: ceftobiprolu i ceftaroliny. Gronkowiec złocisty wypracował kilka mechanizmów w walce z antybiotykami beta-laktamowymi, które swoje działanie kierują na białka wiążące penicyliny będące kluczowe w syntezie peptydoglikanów. W odpowiedzi na antybiotyki bakterie wprowadzają mutacje w PBP, wytwarzają dodatkowe PBP, np. PBP2A oraz syntetyzują enzymy, beta-laktamazy, które rozrywają wiązania w pierścieniach β -laktamowych antybiotyków. Enzymy te kodowane są przez gen *blaZ*, zwykle znajdujący się w operonie *blaI-blaR1-blaZ*, który pozyskiwany jest przez bakterie poprzez plazmidy i transpozony. W normalnych warunkach antybiotyki beta-laktamowe wiążą się z PBP, blokując jego funkcję transpeptydazową i prowadząc do przerwania tworzenia sieci peptydoglikanu. W efekcie komórka bakteryjna staje się niestabilna osmotycznie i ulega lizie, co prowadzi do jej śmierci. Jednak w szczepach MRSA posiadających dodatkowe białko PBP2A o zmniejszonym powinowactwie do antybiotyku, przejmuje ono funkcję transpeptydazy i zapewnia dalszą syntezę peptydoglikanu, co pozwala bakteriom na przetrwanie pomimo działania antybiotyków i blokowania białka PBP. Synteza tego białka związana jest z obecnością operonów *mecI-mecR1-mecA* lub *mecIc-mecR1c-mecC* albo operonu Δ *mecR1-mecA* zlokalizowanych w SCCmec, które odpowiadają za ekspresję genu *mecA*. Opisano 14 głównych typów gronkowcowej kasety chromosomowej.

Niektóre szczepy *S. aureus* wykazują oporność na beta-laktamy, mimo braku typowego mechanizmu opartego na *mecA*. W szczepach *S. aureus* o zmodyfikowanym białku

wiążącym penicylinę (MODSA, *ang. modified penicillin-binding protein S. aureus*) lub metycylooopornych z brakującym *mec* (MRLM, *ang. methicillin-resistant lacking mec*) rzadkie mutacje w genach PBP2 i PBP4 mogą powodować oporność na oksacylinę, poprzez nadprodukcję zmienionego PBP4, które omija mechanizm działania antybiotyków. W szczepach MSSA i MRSA mutacje w PBP4 i PBP2A były odpowiedzialne za oporność na ceftobiprol i ceftarolinę. W MRSA, oporność na te leki wynikała bezpośrednio z mutacji w *mecA*, modyfikujących kluczowe domeny wiążące penicylinę (BND, *ang. penicillin-binding domain*) oraz inne rejony białka PBP2A (Craft i in. 2019; Młynarczyk-Bonikowska i in. 2022).

Oporność na glikopeptydy i lipoglikopeptydy

Antybiotyki z grup gliko- i lipoglikopeptydów także hamują syntezę peptydoglikanu i są bakteriobójcze, jednak mają odmienny mechanizm działania od beta-laktamów. Formują one wiązania z dipeptydem D-Ala-D-Ala w prekursorze peptydoglikanu, co odbywa się poza błoną cytoplazmatyczną komórki. Ponadto lipoglikopeptydy wiążą się z błoną cytoplazmatyczną powodując jej depolaryzację i prowadząc do śmierci komórki. Oporność na glikopeptydy u gronkowca złocistego uwarunkowana jest obecnością operonu *VanA*, kodującego przynajmniej siedem genów, które zapewniają oporność na wankomycynę i teikoplaninę. Operon ten został przysposobiony w MRSA w postaci transpozonu pozyskanego na plazmidzie. Geny *Van* warunkują zmiany w dipeptydach D-Ala-D-Ala przez co uniemożliwiają wankomycynie wiązanie z monomerami prekursorów peptydoglikanowych łańcuchów i wstrzymanie syntezy ściany komórkowej. Taka odmiana gronkowca nazywana jest oporną na wankomycynę - VRSA (Rubinstein & Keynan 2014; Młynarczyk-Bonikowska i in. 2022).

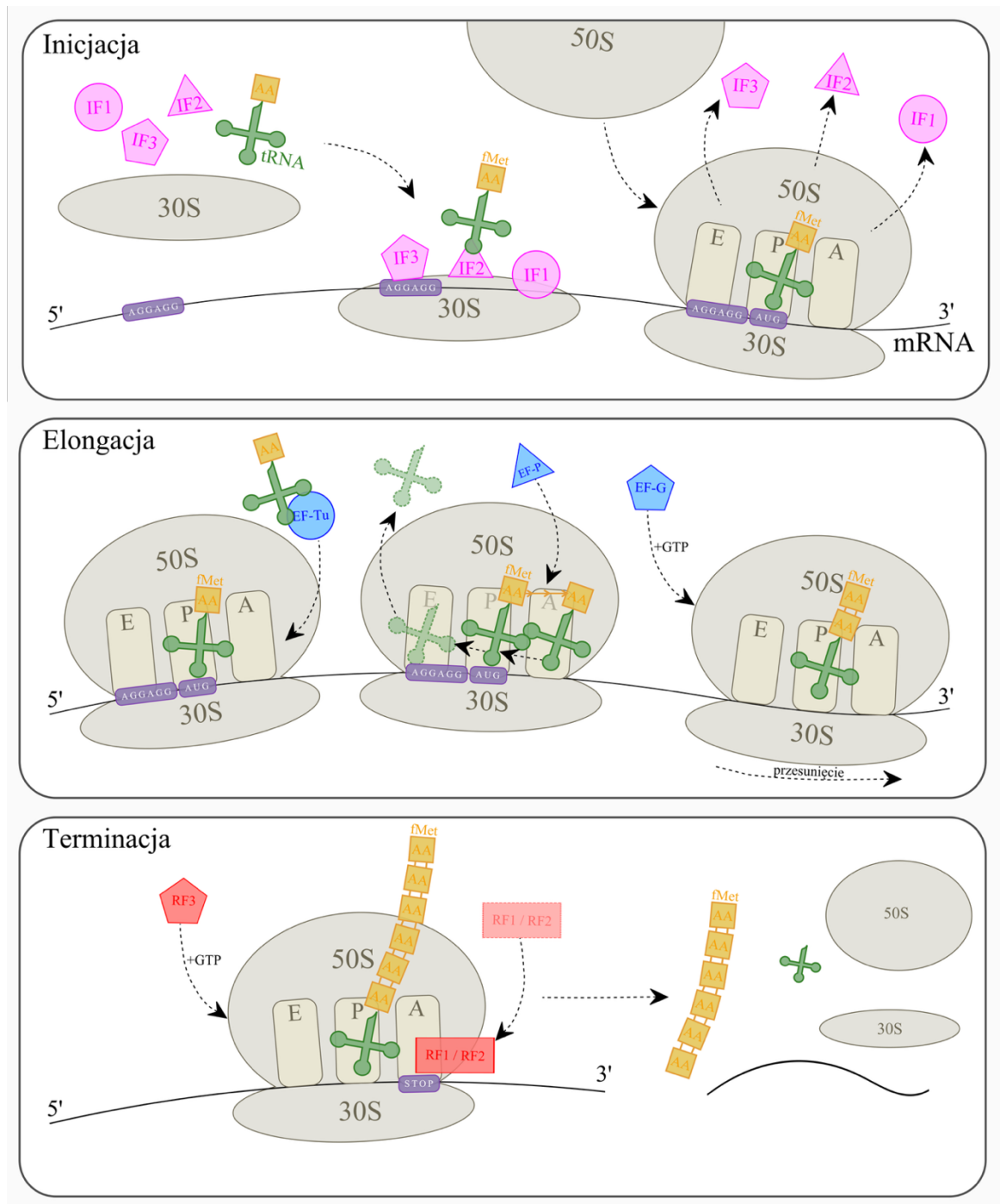
Opisano także szczepy gronkowca złocistego opornego na oksazolidynony, makrolidy, linkozamidy, ketolidy i streptograminy B, aminoglikozydy, spektynomycynę, fluorochinolony, tetracykliny, mupirocynę, kwas fusydowy, daptomycynę, streptograminy A, chinuprystyny-dalfoprystyny, ryfampicyne, chloramfanikol, fosfomycynę i trimetoprim (Młynarczyk-Bonikowska i in. 2022). Zdolność bakterii do szybkiej adaptacji sprawia, że pomimo dostępności antybiotyków nowej generacji, takich jak deptomycyna, wankomycyna i linezolid, nieustannie pojawiają się kolejne izolaty MRSA dla których nie ma skutecznej metody leczenia (Craft i in. 2019).

1.4. Translacja jednym z podstawowych procesów w cyklu życia bakterii

Translacja stanowi jeden z fundamentalnych procesów komórkowych, umożliwiających przekształcenie informacji genetycznej zawartej w mRNA w funkcjonalne białka, które pełnią różnorodne role strukturalne i enzymatyczne. Proces ten, zachodzący w rybosomach jest nie tylko precyzyjnie regulowany, ale również wyjątkowo energochłonny (Ingolia i in. 2019). U bakterii translacja przebiega według schematu obejmującego inicjację, elongację oraz terminację. Każdy z tych etapów wymaga udziału specyficznych czynników molekularnych i precyzyjnej koordynacji, co czyni translację jednym z najbardziej złożonych mechanizmów w cyklu życia komórki (Rycina 1). Zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw funkcjonowania komórki bakteryjnej, w tym procesów takich jak translacja, jest kluczowe dla opracowania nowych strategii terapeutycznych. Postęp w technikach biologii molekularnej, takich jak sekwencjonowanie RNA czy analiza strukturalna rybosomów, pozwala na coraz dokładniejsze opisanie tych procesów.

1.4.1. Przebieg translacji u bakterii

Translacja to ostatni etap ekspresji genu, podczas którego sekwencja kodująca mRNA zostaje przetłumaczona na sekwencję aminokwasów w białku. Proces ten jest dynamiczny i składa się z trzech głównych faz: inicjacji, elongacji (wydłużania), terminacji (zakończenia) oraz następującym po nich recyklingu rybosomu. W każdej fazie rybosom współpracuje tymczasowo z dodatkowymi czynnikami translacyjnymi, które wspomagają syntezę białka. Oprócz zmian składu kompleksów rybosomalnych, ważną rolę odgrywają również zmiany konformacyjne zarówno rybosomu, jak i zasocjowanych czynników — napędzają one proces translacji we właściwym kierunku. Podczas fazy inicjacji rybosom rozpoznaje mRNA i wybiera kodon startowy. U bakterii ten proces odbywa się kotranskrypcyjnie, co oznacza, że rybosom zaczyna działać, jeszcze podczas syntezy mRNA przez polimerazę RNA. Synchronizacja tych dwóch procesów zapewnia stabilność mRNA i kontrolę ich jakości (Geissmann i in. 2009; Simonetti i in. 2009; Rodnina 2018). Najlepiej poznany mechanizm inicjacji translacji dotyczy mRNA zawierających sekwencję Shine-Dalgarno (SD), która umożliwia połączenie małej podjednostki rybosomu (SSU, *ang. small subunit*) z mRNA.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie procesu translacji u bakterii. Proces ten dzieli się na trzy etapy: 1) Inicjacja 2) Elongacja 3) Terminacja. Translacja przeprowadzana jest przez duże kompleksy rybonukleoproteinowe, rybosomy. Na początkowym etapie translacji czynniki które ją inicjują powodują przyłączenie mRNA oraz małej podjednostki rybosomalnej (30S) do rejonu RBS i rozpoznanie kodonu start. Następnie do kompleksu dołącza duża podjednostka rybosomalna by utworzyć kompleks 70S i rozpocząć etap elongacji. Podczas wydłużania rybosom przesuwa się po mRNA i syntetyzuje polipeptyd do momentu osiągnięcia kodonu stop, wtedy łańcuch białkowy zostaje uwolniony a rybosom opuszcza transkrypt (na podstawie King & Gerber 2016).

Ta interakcja jest wspierana przez czynniki inicjujące (IFs, *ang. initiation factors*): IF1 (zapewnia by pierwszy aminoacylo-tRNA trafił w odpowiednie miejsce), IF2 (wiążące inicjatorowe tRNA z formylometioniną – fMet-tRNA^{fMet}) i IF3 (odpowiedzialny za dokładność rozpoznania kodonu startowego). W przypadku klasycznej inicjacji z udziałem sekwencji Shine-Dalgarno, kompleks tworzy się etapowo: najpierw powstaje kompleks preinicjacyjny (PIC) 30S z udziałem małej podjednostki rybosomu, czynników IF1, IF2, IF3 i fMet-tRNA^{fMet}. Po rozpoznaniu kodonu startowego formuje się kompleks inicjacyjny (IC) 30S z obecnym mRNA. Następnie dołącza duża podjednostka 50S i równocześnie następuje odłączenie czynników inicjacyjnych, co prowadzi do uformowania dojrzałego kompleksu 70S gotowego do elongacji. Rozpoznanie kodonu startowego zmienia konformację kompleksu, stabilizuje wiązanie z tRNA. Elongacja to powtarzalny cykl trzech głównych zdarzeń: rozszyfrowania kodonu (dekodowania), tworzenia wiązania peptydowego oraz translokacji rybosomu wzdłuż mRNA. Proces rozpoczyna się, gdy rybosom odczytuje drugi kodon otwartej ramki odczytu (ORF – *ang. open reading frame*) i trwa aż do napotkania kodonu stop. Mechanizm elongacji jest zasadniczo taki sam u bakterii i eukariontów. Bierze w nim udział zestaw wysoko zachowanych czynników elongacyjnych (EFs, *ang. elongation factors*) w tym: EF-Tu/eEF1A (dostarczający aminoacylo-tRNA), EF-G/eEF2 (przesuwający rybosom), EF-P/eIF5A (wspierający tworzenie wiązania peptydowego), SelB / EFsec (odpowiedzialny za insercję selenocysteiny). Podczas dekodowania rybosom rozpoznaje kodon w miejscu A, dopasowując odpowiedni aminoacylo-tRNA (aa-tRNA) dostarczony przez kompleks EF-Tu•GTP. W miejscu aktywnym rybosomu aminokwas przyłączony do aa-tRNA reaguje z peptydylo-tRNA, tworząc nowe wiązanie peptydowe i wydłużając łańcuch białkowy. Po utworzeniu wiązania peptydowego rybosom przechodzi w tzw. stan rotacyjny, w którym tRNA przyjmują pozycje hybrydowe. To przygotowuje układ do translokacji, czyli przesunięcia tRNA i mRNA o jeden kodon. Proces ten nie zachodzi samoczynnie – wymaga udziału czynnika elongacyjnego EF-G, który napędza ruch dzięki hydrolizie GTP. Rybosom przechodzi przez wiele pośrednich konfiguracji, a przesunięcia jego podjednostek (rotacja i "skręcanie" główki SSU) umożliwiają stopniowe przemieszczenie tRNA. EF-G stabilizuje odpowiednie konformacje i pomaga odłączyć antykodony tRNA od kodonów mRNA, co umożliwia dalszy ruch tRNA do klasycznych pozycji P i E. Na końcu EF-G i tRNA z miejsca E opuszczają rybosom, który wraca do stanu wyjściowego gotowego na kolejną rundę elongacji. Terminacja rozpoczyna się, gdy rybosom natrafia na kodon stop (UAG, UAA lub UGA) w mRNA. Te kodony rozpoznawane są przez

czynniki uwalniające: RF1 (rozpoznaje UAG/UAA) i RF2 (UGA/UAA), które wiążą się z miejscem A rybosomu. RF1/RF2 hydrolizują wiązanie estrowe między tRNA a nowo zsyntetyzowanym peptydem w centrum peptydylotransferazowym rybosomu z pomocą zachowawczego motywu GGQ. Produktami tej reakcji są wolny łańcuch białkowy i niezwiązane tRNA. Czynniki RF1/RF2 wspiera proces poprzez usuwanie RF1/RF2 z rybosomu, wykorzystując GTP jako źródło energii. Chociaż mechanizm jego działania nie jest jeszcze w pełni poznany, wiadomo, że stabilizuje on rybosom i ułatwia uwolnienie czynników terminacyjnych po zakończeniu translacji. W ostatniej fazie następuje recykling rybosomu. Po zakończeniu translacji rybosom nadal zawiera mRNA i tRNA, które muszą zostać usunięte, by podjednostki mogły wziąć udział w kolejnej rundzie inicjacji. U bakterii recykling rybosomu jest napędzany przez czynnik recyklingu rybosomu (RRF, *ang. ribosome recycling factor*) i EF-G, który zużywa GTP do rozdzielania podjednostek rybosomalnych. RRF wiąże się w miejscu A rybosomu i stabilizuje rotacyjny stan rybosomu, co przygotowuje go do rozdzielania. Po rozdzieleniu podjednostek tRNA jest usuwane przy udziale czynnika RF3, a mRNA odłącza się spontanicznie (Simonetti i in. 2009; Rodnina 2018).

1.4.2. Regulacja poziomu translacji

Translacja jest jednym z najbardziej energochłonnych procesów, dlatego kontrola tego procesu jest niezwykle istotna dla przetrwania komórki. Ścisła kontrola syntezy białek jest niezbędna zarówno w stałych, jak i zmiennych warunkach środowiskowych, aby utrzymać właściwy poziom białek kluczowych dla funkcjonowania komórki (Ingolia i in. 2019). Poziom mRNA nie zawsze koreluje z liczbą białek, które koduje i które z niego powstaną. Związane jest to z kontrolą syntezy białek oraz ich degradacją (King & Gerber 2016). Bakterie wykształciły w toku ewolucji liczne mechanizmy umożliwiające szybką adaptację do warunków środowiska poprzez natychmiastową regulację ekspresji genów. Kontrola ta zachodzi na poziomie poszczególnych mRNA lub globalnie. W tym drugim przypadku regulacja odbywa się poprzez oddziaływanie na czynniki inicjujące translację, w taki sposób by obniżyć poziom translacji większości mRNA. Na poziomie konkretnych transkryptów regulacja może odbywać się w orientacji *trans*- lub *cis*- z udziałem m.in. białek wiążących RNA, niekodujących RNA (ncRNAs, *ang. non-coding RNAs*), wewnętrznych struktur mRNA takich jak ryboprzełączniki, ramek odczytu położonych powyżej sekwencji kodującej (uORFs, *ang. upstream ORFs*), czy mechanizmu

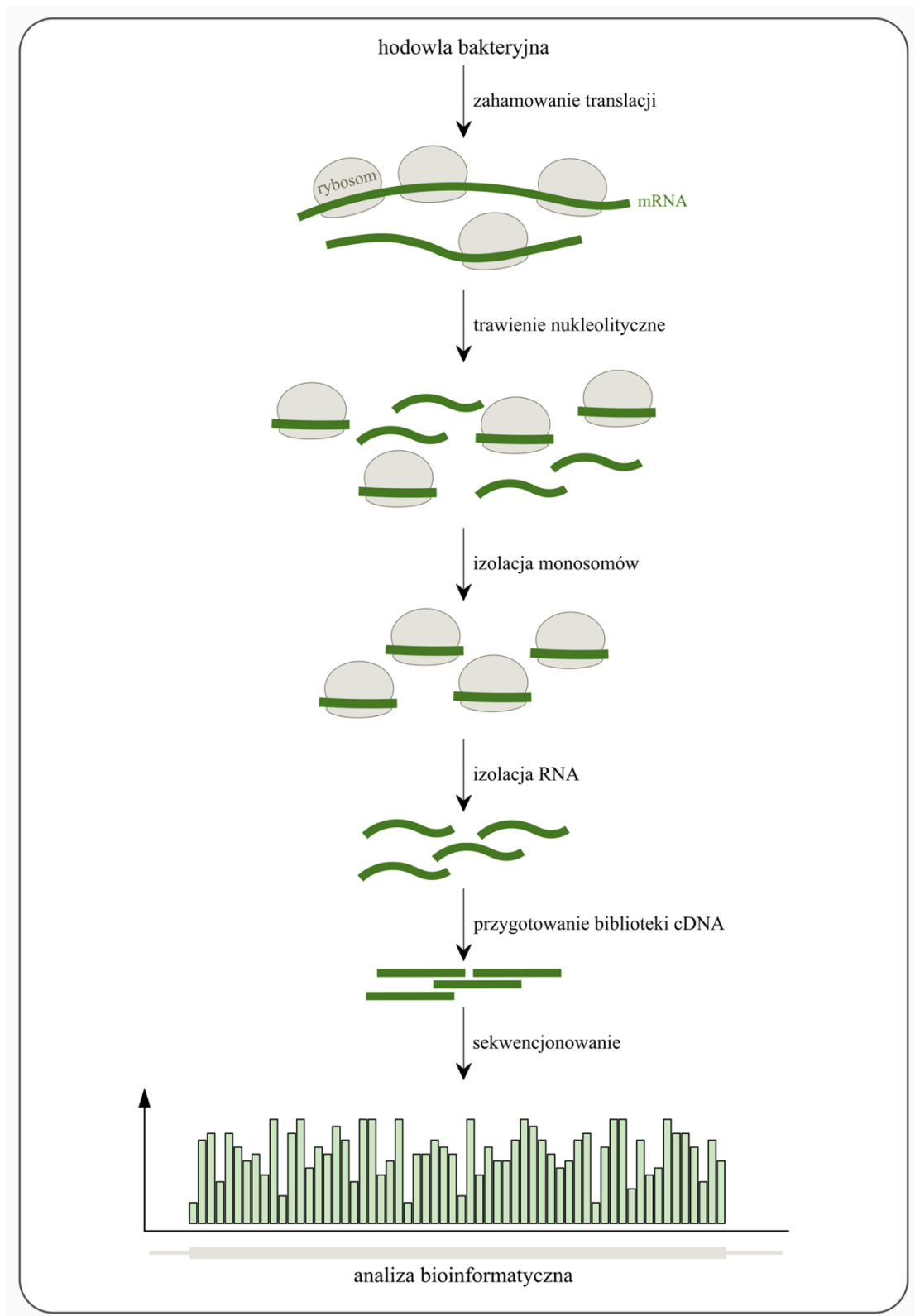
programowanej zmiany ramki odczytu (*ang. programmed frameshifting*) (King & Gerber 2016; Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

1.4.3. Metody badania poziomu translacji

Jedną z pierwszych technik badania translatomu opracowaną w latach 60-tych, jest profilowanie polisomów. Bazuje ona na rozdzieleniu transkryptów związanych z rybosomami, wolnych RNA oraz wolnych podjednostek rybosomalnych poprzez wirowanie w gradiencie cukrowym i następnie izolację oraz sekwencjonowanie RNA z każdej frakcji wykorzystując mikromacierz cDNA (*ang. complementary DNA*) lub technikę RNA-seq. W badaniach porównawczych dotyczących translacji w różnych warunkach zakłada się, że zmiany ilości mRNA obserwowane w poszczególnych frakcjach gradientu odzwierciedlają zmiany w efektywności translacji konkretnych genów. Podejście to umożliwia analizę wpływu czynników stresogennych oraz substancji leczniczych na proces translacji, a także pozwala na ocenę mechanizmów regulujących ten proces. Metoda ta została wykorzystana do badań na drożdżach, komórkach ssaków, roślin, owadów a także bakterii. Jedną z wad tej metody jest długotrwała i czuła na błędy procedura, uwzględniająca m. in. konieczność użycia ultrawirówki, która nie pozwala także na przetwarzanie zbyt wielu próbek jednocześnie. Wykorzystanie gradientu cukrowego wiąże się także z koniecznością dokładniejszego oczyszczenia materiału do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania, które dodatkowo mogą być zanieczyszczone przez inne cząsteczki, przez co próbki, które podlegają metodzie muszą być stosunkowo duże, by na końcu otrzymać odpowiednią ilość dobrej jakości RNA (King & Gerber 2016).

Inną z technik badania translatomu jest profilowanie rybosomalne (Ribo-seq). Jest to zaawansowana technika badania translatomu, umożliwiająca analizę translacji *in vivo* z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu i tym samym przyczynia się do lepszego poznania tego złożonego procesu komórkowego. Metoda ta pozwala na precyzyjne określenie pozycji rybosomów na transkryptach oraz identyfikację aktywnie tłumaczonych regionów mRNA (Ingolia et al. 2009, 2019).

Główne etapy Ribo-seq zostały przedstawione na Rycinie 2. Eksperyment rozpoczyna się od zatrzymania translacji w komórkach poprzez zastosowanie inhibitorów elongacji (np. cykloheksymid) lub inicjacji (np. harringtonina, laktimidomycyna), co pozwala na unieruchomienie rybosomów w ich aktualnym stanie funkcjonalnym. Alternatywnie stosuje się szybkie mrożenie komórek w ciekłym azocie (King & Gerber 2016).



Rycina 2. Profilowanie rybosomalne (Ribo-seq). Technika pozwalająca na identyfikację aktywnie tłumaczonych fragmentów mRNA poprzez sekwencjonowanie krótkich odcinków chronionych przez rybosomy. Proces obejmuje zatrzymanie translacji, trawienie niezwiązanych fragmentów RNA, izolację monosomów, izolację RNA, przygotowanie bibliotek cDNA oraz analizę bioinformatyczną (Ingolia et al. 2009, 2019; King & Gerber 2016).

Następnie komórki są lizowane w buforze o niskiej sile jonowej, co sprzyja aktywności rybonukleaz przy jednoczesnym zachowaniu integralności rybosomów. W kolejnym etapie niezwiązane fragmenty mRNA są trawione enzymem nukleolitycznym (np. RNaza I, T1 lub nukleaza S7), pozostawiając jedynie krótkie fragmenty mRNA chronione przez rybosomy – tzw. RPFs (*ang. ribosome-protected fragments*). Dobór enzymu jest kluczowy dla jakości uzyskanych danych, ponieważ różne organizmy wykazują odmienną tolerancję na działanie rybonukleaz (King & Gerber 2016). Po trawieniu izoluje się monosomy, najczęściej poprzez wirowanie w gradiencie sacharozowym lub filtrację żelową. Aby zminimalizować obecność rRNA w próbkach, stosuje się sondy komplementarne znakowane biotyną, które umożliwiają jego usunięcie metodą chromatografii powinowactwa lub z użyciem kulek magnetycznych (Ingolia et al. 2019; King & Gerber 2016). Wyizolowane fragmenty RNA (typowo 26–34 nt) są rozdzielane elektroforetycznie, alternatywnie, w nowszych podejściach, etap usuwania rRNA jest pomijany – po inkubacji frakcji z proteinazą K następuje izolacja RNA metodą fenol-chloroform z odpowiednich frakcji gradientu (Bezrukov et al. 2021). Następnie RNA wykorzystuje się do przygotowania bibliotek cDNA. Proces ten obejmuje ligację adapterów, odwrotną transkrypcję oraz amplifikację z użyciem indeksowanych starterów. Gotowe biblioteki są sekwencjonowane z wykorzystaniem technologii NGS (*ang. next-generation sequencing*), sekwencjonowania nowej generacji, co umożliwia równoległy odczyt milionów RPF i ich mapowanie względem genomu (Ingolia et al. 2009; Ingolia et al. 2019; Kaźmierczak & Kwaśniak-Owczarek 2019). Charakterystyczną cechą danych uzyskanych w Ribo-seq jest trójnukleotydomowa periodyczność odczytów, wynikająca z przesuwania się rybosomów po transkrypcie. Dzięki wysokiej rozdzielczości możliwe jest nie tylko określenie położenia rybosomów, ale także identyfikacja nowych ramek odczytu (uORF, *ang. undiscovered open reading frames*), miejsc startu translacji oraz punktów jej pauzowania (Ingolia et al. 2019; King & Gerber 2016). Profilowanie rybosomalne znajduje szerokie zastosowanie w badaniach nad regulacją translacji, zwłaszcza w warunkach stresu komórkowego lub działania leków, zarówno u organizmów modelowych, jak i u ludzi. Podobnie jak w przypadku profilowania polisomów, technika ta wymaga dużej ilości materiału początkowego oraz jest czasochłonna – cały eksperyment trwa około 7 dni (King & Gerber 2016). Dodatkowe wyzwanie stanowi analiza bioinformatyczna odczytów uzyskanych tą techniką pozwalająca na identyfikację syntetyzowanych białek, określenie gęstości i położenia aktywnych rybosomów na transkryptach a także oznaczenie poziomu translacji (Ingolia i in. 2019; King & Gerber 2016).

1.5. Rola struktury drugorzędowej RNA w regulacji ekspresji genów u bakterii

Struktura RNA ma charakter hierarchiczny i składa się z wielu motywów, takich jak spinki, wybrzuszenia, pętle wewnętrzne i apikalne, pseudowęzły oraz węzły łączące, które wspólnie kształtują jego strukturę trzeciorzędową (Mailler i in. 2019). Ekspresja genów jest regulowana przez różne mechanizmy, obejmujące kontrolę transkrypcji, translacji i przetwarzania mRNA. Coraz większe znaczenie zyskują też mechanizmy regulacji potranskrypcyjnej oparte o małe bakteryjne RNA (sRNA, *ang. small RNA*), które wiążą się z mRNA i wpływają na jego stabilność, transkrypcję lub translację. Istotną rolę odgrywa również struktura drugorzędowa mRNA, rejonów 5' nieulegających translacji (5' UTR, *ang. untranslated region*), której zmiany mogą stanowić sygnały modulujące procesy transkrypcji i translacji. Szczególną rolę w tego typu regulacji odgrywają rybobprzełączniki (*ang. riboswitches*) występujące głównie w niekodujących regionach mRNA bakterii. Wiążą one konkretne metabolity (np. aminokwasy, nukleotydy, kofaktory, jony metali), co prowadzi do zmiany struktury RNA i regulacji ekspresji genów. Rybobprzełączniki mogą wpływać na zakończenie transkrypcji, dostępność miejsca inicjacji translacji, degradację mRNA a u eukariontów także na splicing mRNA (Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016; Bédard i in. 2020; Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

1.5.1. Dynamika struktury RNA

Zmiany strukturalne RNA zachodzą w skali mikrosekund co umożliwia szybkie przekazywanie sygnału i adaptację bakterii do zmian środowiska. Każda cząsteczka RNA może zmieniać swoją strukturę, która jest stabilizowana lub destabilizowana w określonych warunkach, a w większości przypadków wiele struktur alternatywnych danego RNA współistnieje ze sobą w komórce w określonej równowadze. W związku z tym strukturę RNA można opisać jako zbiór wielu konformacji, z czego każda z nich posiada własną wartość energii swobodnej które łącznie tworzą krajobraz energetyczny zbioru struktur danego RNA. Niższa energia swobodna zapewnia większą stabilność termodynamiczną stąd poszczególne konformacje występują w zbiorze z różną częstotliwością, co powoduje, że krajobraz strukturalny RNA zdominowany jest przez jedną lub kilka stabilnych struktur. Im większa różnica wartości energii pomiędzy alternatywnymi konformacjami tym większa jest bariera energetyczna do przekroczenia podczas zmian strukturalnych. Energię

pozwalającą na jej pokonanie mogą zapewnić zewnętrzne czynniki, np. wiązanie jonów, metabolitów czy zmiana temperatury. Dochodzi wtedy do przesunięcia energii swobodnej potrzebnej do pokonania bariery energetycznej i redystrybucji zbioru konformacyjnego. Zmiany te mają charakter przejściowy i po ustąpieniu czynnika inicjalizującego zmianę układ konformacyjny wraca do stanu równowagi (Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

1.5.2. Regulacja translacji indukowana zmianami w strukturze drugorzędowej RNA

Proces translacji może być regulowany na każdym etapie — od inicjacji, przez elongację i terminację, aż po recykling rybosomów — jednak najbardziej efektywnym mechanizmem jest kontrola na etapie inicjacji, ze względu na to, że jest to jeden z kluczowych etapów podlegający ścisłej kontroli w komórce (Simonetti et al. 2009; Chełkowska-Pauszek i in. 2021). Najczęściej wykorzystywane i najsukuteczniejsze mechanizmy regulacji translacji zależne od RNA opierają się na modulacji dostępności strukturalnej miejsca wiązania rybosomu (RBS, *ang. ribosome binding site*). Regulatory RNA można ogólnie podzielić na dwie grupy: działające w *cis* oraz działające w *trans* (Chełkowska-Pauszek i in. 2021). Termosensory i ryboprzełączniki należą do najpowszechniejszych struktur RNA regulujących translację w orientacji *cis*. Ryboprzełączniki to struktury RNA, które poprzez bezpośrednie wiązanie małych cząsteczek (ligandów) zmieniają swoją konformację, regulując ekspresję genów na poziomie transkrypcji lub translacji (opisane szczegółowo w następnym rozdziale). RNA pełniące funkcję termosensorów komórkowych kontroluje ekspresję genów bakterii poprzez zmiany strukturalne wywoływane zmianą temperatury. W przeciwieństwie do ryboprzełączników nie znajduje się u nich zachowawczości w sekwencjach. Wyróżnia się dwa typy termosensorów: lokalne (*cis*), regulujące inicjację translacji mRNA w którym się znajdują, oraz działające na odległość (*trans*), oparte na modulacji wiązania docelowej sekwencji antysensownej. Mechanizm w orientacji *cis* opiera się na rozpleceniu struktur dwuniciowych w obrębie sekwencji Shine-Dalgarno i kodonu startowego wraz ze wzrostem temperatury, co umożliwia translację. Z kolei regulacja w orientacji *trans* wymaga obecności cząsteczki RNA, która poprzez komplementarność w rejonie wiązania rybosomu destabilizuje jego strukturę. Działanie termometrów RNA zależy od obecności pętli i słabych wiązań w rejonie wiązania rybosomu, które są podatne na zmiany temperatury. Regulacja translacji z udziałem termosensorów może odbywać się poprzez zaplatanie bądź topienie wiązań w strukturze

drugorzędowej RNA lub poprzez formowanie dodatkowej stabilnej struktury (Kortmann & Narberhaus 2012; Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

Struktury drugorzędowe RNA mogą wpływać na translację także poprzez wstrzymywanie rybosomów przesuujących się po mRNA, a w niektórych przypadkach wywoływanie ich kolizji. Zwiększona częstotliwość pauzowania prowadzi do obniżonej wydajności syntezy białek, gdyż wydłuża czas translacji pojedynczych cząsteczek mRNA, zmniejszając liczbę powstających białek. Pauzy mogą być wywoływane przez stabilne regiony strukturalne mRNA blokujące rybosomy zarówno na etapie inicjacji translacji, jak i podczas przesuwania rybosomu. Aktywność helikazy, pozwalająca na rozplatanie struktur RNA, jaką posiadają rybosomy sprawia, że wstrzymanie procesu translacyjnego jest zazwyczaj tymczasowe. Jednakże przyłączenie wielu rybosomów do tej samej cząsteczki matrycowej w skrajnych przypadkach może prowadzić do ich kolizji, co rozpoznawane jest przez komponent bakteryjnego systemu kontroli jakości translacji i powoduje degradację syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego.

W regulacji translacji u bakterii mogą uczestniczyć również struktury wyższego rzędu. G-kwadrupleksy (G4s) to bogate w guaninę motywy strukturalne, pierwotnie odkryte w DNA, które mogą tworzyć co najmniej dwa zestawione kwartety guaninowe stabilizowane przez jony potasu (K^+). Taka struktura może być również tworzona przez RNA (rG4s). Niedawne badania wykazały związek rG4s z istotnymi procesami biologicznymi, między innymi regulacją procesów metabolicznych i ekspresji genów (Geissmann 2009; Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

Struktura RNA jest zależna także od cząsteczek, które na nią wpływają w orientacji *trans*, włączając w to białka i niekodujące RNA. Białka regulatorowe mogą wiązać się z mRNA w pobliżu RBS by zablokować dostęp rybosomu do sekwencji SD lub by wywołać zmiany strukturalne wpływające na dostępność RBS. Podobny efekt może powodować parowanie antysensowego ncRNA niedaleko RBS. Translacja może być też pozytywnie regulowana przez ncRNA i białka, kiedy to ich wiązanie do mRNA uwalnia sekwencję RBS, która była uwikłana w strukturę drugorzędową (Geissmann 2009; Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

1.5.3. Ryboprzełączniki i ich potencjał przy tworzeniu nowych terapii antybakteryjnych

Ryboprzełączniki są jednym z najpowszechniej występujących mechanizmów regulacji ekspresji genów opartych o RNA u bakterii. Wykazują ogromną różnorodność struktur a

jednocześnie geny przez nie kontrolowane biorą udział w kluczowych szlakach metabolicznych i procesach komórkowych. Obecnie wyróżnia się ponad 55 klas tych regulatorów, które zostały zweryfikowane eksperymentalnie. Powszechnie występują w rejonach niekodujących 5' mRNA, na których ekspresję wpływają. Rozmiar ryboprzełączników waha się pomiędzy 34 a 200 nukleotydami, działają one w orientacji *cis* i składają się z dwóch części strukturalnych – aptameru, przez który wychwytywany jest ligand, oraz platformy ekspresyjnej, która zmienia swoją strukturę i reguluje ekspresję genów (Machtel i in. 2016; Chełkowska-Pauszek i in. 2021; Salvail & Breaker 2023). Szczególnym przypadkiem są ryboprzełączniki posiadające dwa aptamery, które działają w tandemie w odpowiedzi na ten sam lub inny ligand (Bédard i in. 2020).

Pod względem struktury wyróżnić można dwie grupy ryboprzełączników – pseudowęzłowe oraz połączeniowe. Te pierwsze charakteryzuje obecność dwóch helis RNA zakończonych pętlami, które tworzą wiązania pomiędzy sobą, w tych drugich występuje jedna centralna pętla będąca połączeniem pomiędzy wieloma helisami (Machtel i in. 2016). Wyróżnia się dwa modele wiązania ligandu: selekcję konformacyjną oraz dopasowanie indukowane. Pierwszy zakłada, że jedna z dynamicznie zmieniających się konformacji aptameru stabilizuje się dzięki połączeniu z ligandem, natomiast drugi model polega na tym, że to wiązanie ligandu wywołuje zmianę konformacyjną aptameru. Niektóre ryboprzełączniki mogą wykorzystywać oba z tych modeli (Chełkowska-Pauszek i in. 2021).

Ryboprzełączniki dzielą się na klasy ze względu na to, na jaki ligand reagują oraz na podklasy, ze względu na różnice strukturalne oraz mechanizm, który regulują (Bédard i in. 2020). Ryboprzełączniki mogą wykrywać szeroką gamę ligandów, których grupy przedstawiono w Tabeli 2. Wyróżnia się dwa podstawowe stany konformacyjne ryboprzełączników – ze związanym ligandem oraz bez ligandu, niemniej jednak badania wykazały także inne stabilne strukturalnie konformacje i mogą one działać na ekspresję genów wyciszająco lub aktywująco na poziomie transkrypcji, translacji oraz degradacji, jak również u eukariontów poprzez modulację splicingu lub interferencji RNA (Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016).

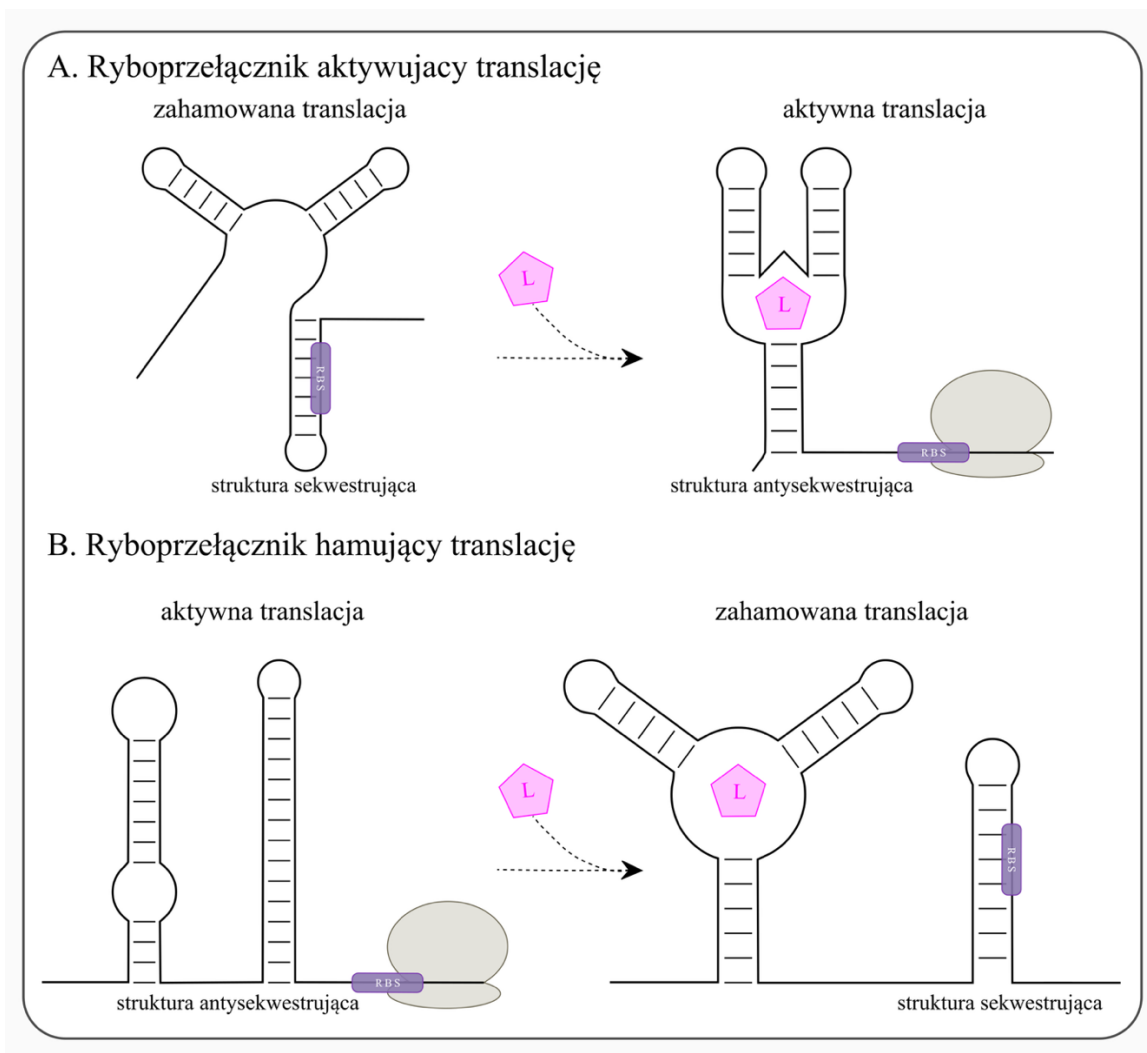
Najbardziej powszechnym mechanizmem jest obecna przede wszystkim u bakterii Gram-dodatnich kontrola zakończenia transkrypcji, gdzie w odpowiedzi na związanie ligandu formowana jest drugorzędowa spinka terminacyjna będąca sygnałem końca transkrypcji. W tym przypadku spadek stężenia ligandu powoduje, że stabilizuje się struktura antyterminatora, co z kolei umożliwia ponowne uruchomienie ekspresji genu.

Tabela 2. Grupy ligandów biorące udział w regulacji ekspresji genów u bakterii (Winkler & Breaker 2003; Vitreschak i in. 2004; Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016; Breaker 2018; Bedard i in 2020; Salvail & Breaker 2023).

Grupa ligandów	Przykładowe ligandy	Mechanizm regulacji ryboprzełączników
Koenzymy i związki pokrewne	AdoCbl, TPP, FMN, SAM, SAH, THF, Moco/Tuco	Transkrypcja (terminacja), translacja (maskowanie RBS), rybozomy
Puryny i ich pochodne	Guanina, preQ1, dG, c-di-GMP, c-di-AMP	Transkrypcja, translacja, splicing
Aminokwasy	Lizyna, glicyna, glutamina	Translacja (maskowanie RBS, cięcie RNA), degradacja transkryptu
Fosforylowane cukry	GlcN6P (glukozamino-6-fosforan)	Rybozym – degradacja RNA
Jony metali	Mg ²⁺ , F ⁻ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	Transkrypcja (Rho-zależna terminacja), translacja, degradacja

Część ryboprzełączników uczestniczy w zakończeniu transkrypcji zależnym od czynnika Rho — białka obecnego u prokariotów, które wykazuje aktywność helikazy i rozdziela hybrydę RNA–DNA, tym samym przedwcześnie przerywając transkrypcję. Taki mechanizm obserwuje się m.in. w ryboprzełącznikach wykrywających magnez w genie *mgtA* u *Salmonella enterica* oraz w ryboprzełączniku FMN przed genem *ribB* u *E. coli*, gdzie obecność ligandu wspomaga interakcję z helikazami Rho i prowadzi do wcześniejszego zakończenia transkrypcji (Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016).

Na podobnej zasadzie opiera się obserwowana powszechnie u bakterii Gram-ujemnych regulacja inicjacji translacji, gdzie dostępność miejsca wiązania rybosomu lub kodonu start zależna jest od zmian konformacyjnych wywołanych przez utworzenie kompleksu aptamer-ligand. Wyróżnia się dwa główne mechanizmy działania ryboprzełączników translacyjnych, które w zależności od obecności ligandu aktywują bądź hamują translację poprzez uwolnienie miejsca inicjacji translacji lub jego uwikłanie w strukturę drugorzędową. Powoduje to, że miejsce RBS jest bardziej lub mniej dostępne dla rybosomu (Rycina 3) (Vitreschak i in. 2004; Breaker 2018; Bedard i in. 2020; Salvail & Breaker 2023).



Rycina 3. Mechanizm działania ryboprzełączników bazuje na obecności dwóch wzajemnie wykluczających się stabilnych termodynamicznie konformacji, pomiędzy którymi zmieniają swoją strukturę w zależności od obecności lub braku ligandu. Utworzenie kompleksu aptamer-ligand indukuje zmiany strukturalne w platformie ekspresyjnej co skutkuje zwiększeniem lub zmniejszeniem poziomu syntezy białka (na podstawie Ariza-Mateos i in. 2018; Chelkowska-Pauszek i in. 2021).

Ze względu na strukturę wśród ryboprzełączników translacyjnych wyszczególnić można trzy ich rodzaje. W pierwszym z nich RBS stanowi część aptameru, co implikuje, że staje się on niedostępny, gdy ligand zostaje związany. Przykładem tego typu ryboprzełączników są te wiążące adenozylokobalaminę (AdoCbl, koenzym B₁₂), a także ryboprzełączniki SAM-II, których związanie S-adenozylometioniny powoduje maskowanie sekwencji SD w stworzonej strukturze. Kolejnym rodzajem są ryboprzełączniki, w których RBS występuje za strukturą aptameru, więc zmiany strukturalne w obrębie miejsca inicjacji translacji są indukowane przyłączeniem bądź obecnością ligandu docelowego.

Reprezentantami takiego układu strukturalnego są ryboprzełączniki wiążące pirofosforan tiaminy (TPP), w których obecność struktury antysekwestrowej umożliwia wiązanie rybosomu do RBS, natomiast utworzenie struktury sekwestrowej ukrywa RBS w strukturze drugorzędowej i blokuje inicjację translacji (Breaker 2018). Innym przykładem takiego układu strukturalnego są ryboprzełączniki wiążące FMN, którego obecność wywołuje zmiany strukturalne w obrębie sekwencji SD genu *ypaA* u *Bacillus subtilis* (Winkler & Breaker 2003).

Ostatni rodzaj architektury ryboprzełączników translacyjnych stanowi połączenie przedwczesnego zakończenia transkrypcji oraz maskowania RBS w strukturze drugorzędowej poprzez utworzenie spinki terminatorowej obejmującej także miejsce wiązania rybosomu. W ryboprzełącznikach tego typu wiążących TPP wysokie stężenie ligandu powoduje przedwczesne zakończenie transkrypcji, zanim zostanie przepisana pełna ramka odczytu. Przy niskim stężeniu TPP powstaje pełnej długości mRNA, ale jego RBS może zostać zablokowane, jeśli TPP wzrośnie ponownie — dzięki temu mechanizm działa zarówno na etapie transkrypcji, jak i translacji (Breaker 2018). Ryboprzełącznik zależny od TPP reguluje translację genu *thiM* u *E. coli*, translację i transkrypcję genu *thiC* u *E. coli* oraz transkrypcję operonu tiaminy (*tenA*) u *B. subtilis* (Vitreschak i in. 2004; Bedard i in. 2020). Znane są także przypadki bardziej złożonego działania ryboprzełączników, między innymi w przypadku, gdy dochodzi do powstania struktury sekwestrującej i rybosom nie przyłącza się do transkryptu. Powstający mRNA staje się wrażliwy na działanie czynników Rho, powodujących przedwczesne zakończenie transkrypcji. Takie współdziałanie mechanizmów regulacyjnych odnotowano przy udziale ryboprzełączników Mg^{2+} -II oraz FNM (Machtel i in. 2016; Breaker 2018).

Niektóre ryboprzełączniki działają jednocześnie jako rybozomy — enzymatyczne cząsteczki RNA, które po związaniu odpowiedniego ligandu same przecinają własny transkrypt mRNA. Taki wycięty fragment pozbawiony grupy 5' fosforanowej ulega następnie degradacji, co zmniejsza poziom ekspresji genu. Takie działanie zaobserwowano dla ryboprzełączników klasy *glmS*, których ligandem jest pochodna cukru glukozamino-6-fosforan (GlcN6P). Związanie cząsteczki docelowej indukuje aktywność rybozomu, prowadząc do cięcia RNA, które z kolei inicjuje działanie rybonukleazy odpowiedzialnej za szybką degradację transkryptu kodującego enzym GlmS stymulującego syntezę GlcN6P, co zamyka całą pętlę zwrotną tego układu. Kolejnym przykładem takiego bardziej złożonego mechanizmu regulacji powstawania białek jest działanie ryboprzełącznika lizynowego w *E. coli*, który po związaniu ligandu blokuje dostęp do miejsca wiązania

rybosomu i jednocześnie odsłania miejsce cięcia przez RNazę E, wspomagając rozpad transkryptu. Ryboprzełączniki katalityczne mogą też wpływać na splicing RNA — np. ryboprzełącznik c-di-GMP w *Clostridium difficile* nie indukuje zmian strukturalny w obrębie RBS czy prowadzących do powstania struktury terminującej transkrypcji, ale kontroluje wybór miejsca cięcia w intronie, co decyduje o tym, czy końcowy mRNA będzie miał dostępne RBS i pozwoli na translację białka (Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016; Breaker 2018).

Wysoka swoistość i zdolność do szybkiej reakcji czynią ryboprzełączniki obiecującymi narzędziami w projektowaniu biosensorów i antybiotyków. Początkowe zainteresowanie ich rolą w antybiotykoterapii wynikało z obserwacji mechanizmów wiązania czterech znanych związków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych z odpowiednimi ryboprzełącznikami. Przykładowo, rozeoflawina wiąże się z domeną aptamerową ryboprzełącznika FMN, prowadząc do obniżenia ekspresji genów związanych z biosyntezą ryboflawiny. Analogi lizyny, takie jak AEC czy DL-4-oksalizyna, wykazują działanie antibakteryjne poprzez interakcję z ryboprzełącznikiem lizynowym. Mutacje w obrębie tych ryboprzełączników zaburzają skuteczność antybiotyków, co potwierdza ich funkcję jako kluczowych punktów interakcji leku. Badania *in silico* wskazują, że aminoglikozydy – paromomycyna, gentamycyna, kanamycyna – mogą również oddziaływać z ryboprzełącznikami, wykazując powinowactwo porównywalne do naturalnych ligandów. Co więcej, specyficzna interakcja między kanamycyną a ryboprzełącznikiem c-di-GMP została potwierdzona metodą FRET (*ang. Förster Resonance Energy Transfer*), co sugeruje potencjalne alternatywne mechanizmy działania antybiotyków oraz budowania na nie oporności. Najnowsze badania z zastosowaniem technologii term-seq wykazały, że regulatory RNA u bakterii Gram-dodatnich kontrolują ekspresję przynajmniej 4% genów. Wyniki te wzmacniają hipotezę o potencjale ryboprzełączników jako celów terapeutycznych. Ich wysoka swoistość ligandowa oraz powiązanie z genami kluczowymi dla przeżycia i zjadliwości bakterii sprawiają, że ryboprzełączniki stanowią atrakcyjny kierunek w opracowywaniu nowatorskich antybiotykoterapii. W odróżnieniu od klasycznych antybiotyków, ich zastosowanie może wiązać się z niższą toksycznością, ponieważ nie występują u organizmów eukariotycznych, w tym ludzi. Dodatkowo są regulowane przez proste metabolity, które łatwo dostarczyć, wyprodukować i modyfikować. Ryzyko rozwoju oporności na takie leki jest mniejsze, ponieważ jedna mutacja nie wystarcza, by unieszkodliwić ryboprzełączniki obecne w wielu genach bakterii (Aghdam i in. 2016; Machtel i in. 2016).

1.5.4. Metody badania struktury drugorzędowej RNA

Jednym z najefektywniejszych sposobów identyfikacji regulatorów RNA zależnych od zmian konformacyjnych jest próbkowanie struktury RNA. Technika ta polega na wprowadzeniu do komórki chemicznych lub enzymatycznych sond, które w zależności od dostępności strukturalnej nukleotydów oznaczają regiony jedno- i/lub dwuniciowe. Początkowo miejsca reakcji sondy z RNA identyfikowano za pomocą elektroforezy w żelach poliakrylamidowych, następnie elektroforezy kapilarnej, a obecnie dominują metody oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji. Metody wykorzystujące enzymatyczne cięcie RNA, takie jak PARS (*ang. parallel analysis of RNA*) oraz FragSeq (*ang. fragmentation sequencing*) były jednymi z pierwszych metod, które połączyły głębokie sekwencjonowanie z próbkowaniem struktury RNA w skali całego transkryptomu. Wadą tych metod jest to, że wykorzystywane w nich RNazy (np. RNaza A, V1, S1 czy P1) są zbyt duże by przenikać do komórki, więc można je stosować tylko *in vitro*.

Alternatywą dla enzymów są niewielkie związki chemiczne, które mogą modyfikować docelowe RNA zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Chemiczne próbkowanie struktury RNA dzieli się na dwie główne klasy, metody oparte na wykrywaniu oddziaływań (reaktywności) pomiędzy parami zasad oraz metody weryfikujące dostępności struktury dla rozpuszczalnika. Przykładem odczynnika z pierwszej grupy jest DMS - siarczan dimetylu, który metyluje grupy N1 adeniny, N3 cytozyny i N7 guaniny, umożliwiając identyfikację niesparowanych nukleotydów. Sondy chemiczne drugiego rodzaju reagują z grupą 2'-OH rybozy w niesparowanych nukleotydach, co pozwala na analizę dostępności strukturalnej wszystkich czterech typów nukleotydów. W ten sposób działają reagenty stosowane w eksperymentach SHAPE – selektywnej acylacji grupy 2'-hydroksylowej analizowanej metodą wydłużania startera (Mailler i in. 2018; Wang i in. 2021). Do mniej konwencjonalnych metod należy próbkowanie liniowe (*ang. in-line probing*), które wykorzystuje naturalną zdolność RNA do samoistnego rozszczepiania w miejscach elastycznych. Choć technika ta umożliwia mapowanie struktury, jej ograniczeniem jest powolność reakcji, co utrudnia analizę dynamicznych zmian konformacyjnych. Aby zwiększyć wydajność próbkowania, opracowano metody oparte na cięciu indukowanym przez jony metali, z których najczęściej stosowanym jest Pb^{2+} . Reagent ten selektywnie rozszczepia RNA w regionach jednoniciowych oraz w miejscach zaburzonych przez nietypowe parowanie zasad (Mailler i in. 2018).

Po znakowaniu RNA sondami, kluczowym etapem jest odczytanie informacji o miejscach modyfikacji. Istnieją trzy główne strategie, które umożliwiają taką analizę. Pierwsza, strategia cięcia, polega na selektywnym rozszczepieniu RNA przez enzymy lub reagenty chemiczne, a powstałe fragmenty są identyfikowane za pomocą wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Druga strategia, zatrzymania transkrypcji, polega na tym, że zmodyfikowane chemicznie nukleotydy zatrzymują działanie odwrotnej transkryptazy, co pozwala na precyzyjne określenie lokalizacji miejsc reaktywnych na podstawie długości cDNA. Trzecia strategia, profilowanie mutacyjne, opiera się na detekcji mutacji w cDNA, które powstają podczas odwrotnej transkrypcji w obecności zmodyfikowanych nukleotydów. Dzięki temu możliwa jest równoczesna analiza wielu miejsc modyfikacji w jednej cząsteczce RNA, przy jednoczesnym ograniczeniu błędów związanych z degradacją matrycy lub etapami ligacji (Mailler i in. 2018).

Niezależnie od zastosowanej sondy, protokoły eksperymentalne próbkowania strukturalnego RNA mają wspólny schemat. Główne etapy obejmują inkubację komórek w obecności sondy, ekstrakcję RNA, odczyt informacji o miejscu reakcji na podstawie jednego z trzech mechanizmów (cięcia, zatrzymania lub profilowania mutacyjnego), odwrotną transkrypcję (RT, *ang. reverse transcription*) oraz utworzenie biblioteki komplementarnych DNA (cDNA). W zależności od zastosowanej metody, protokoły mogą zawierać dodatkowe etapy usprawniające analizę, takie jak kontrolowana fragmentacja RNA, selektywne wzmacnianie sygnałów z miejsc modyfikowanych oraz redukcja sygnałów z obszarów niemodyfikowanych (Mailler i in. 2018; Wang i in. 2021).

2. CEL ROZPRAWY

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest systemowa analiza roli struktury drugorzędowej mRNA w regulacji translacji genów u metycylinoopornego szczepu *Staphylococcus aureus* (MRSA) w warunkach stresu antybiotykowego. Badania koncentrują się na identyfikacji elementów strukturalnych RNA, które wpływają na efektywność translacji i uczestniczą w adaptacji bakterii do subletalnych stężeń antybiotyków, takich jak wankomycyna i cefoksytyna.

W ramach realizacji pracy doktorskiej postanowiłam odpowiedzieć na następujące pytania badawcze:

- Czy w odpowiedzi na stres antybiotykowy zachodzą istotne zmiany konformacyjne rejonów mRNA uwikłanych w inicjację translacji?
- Czy w odpowiedzi na stres antybiotykowy zachodzą istotne zmiany poziomu translacji mRNA?
- Czy zmiany konformacyjne zachodzące w strukturze drugorzędowej RNA korelują ze zmianami w poziomach translacji poszczególnych transkryptów?

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Opis układu eksperymentalnego

Badania przeprowadzono na szczepie metycylinoopornego gronkowca złocistego (MRSA), hodowanym w trzech warunkach eksperymentalnych:

1. W warunkach kontrolnych
2. W warunkach z subletalnym stężeniem cefoksytyny
3. W warunkach z subletalnym stężeniem wankomycyny

W celu scharakteryzowania struktury drugorzędowej oraz aktywności translacyjnej bakteryjnych mRNA zastosowano odpowiednio techniki SHAPE-map oraz Ribo-seq. Ponieważ w toku eksperymentu SHAPE-Map uzyskiwane są próby nietraktowane sondą strukturalną, które są odpowiednikiem klasycznego eksperymentu RNA-seq, zostały one również wykorzystane jako źródło informacji o poziomach transkryptów dla analizy danych z Ribo-seq. Zgodnie z przyjętym w środowisku naukowym standardem, eksperyment SHAPE-Map wraz z towarzyszącym eksperymentem RNA-seq został wykonany w jednym powtórzeniu biologicznym. Jest to spowodowane wysoką powtarzalnością protokołu, znaczącą dynamiką strukturalną RNA oraz priorytetyzacją uzyskania bardzo głębokiego pokrycia transkryptomów danymi SHAPE-Map w celu dokładnego oznaczenia struktury drugorzędowej RNA. Eksperymenty Ribo-seq wykonane zostały w trzech powtórzeniach biologicznych, jednak ze względu na wysoką powtarzalność uzyskanych wyników oraz zachowanie kompatybilności z danymi RNA-seq, na etapie analizy zostały uśrednione w obrębie powtórzeń poprzez połączenie odczytów.

Oznaczenie próbek

W pracy zastosowano jednolity schemat oznaczeń próbek w formacie: eksperyment_warunek[powtórzenie]

- eksperyment – typ analizy: RIBO, RNA lub SHAPE
- warunek – warunki hodowli: kontrola – K, wankomycyna - W, cefoksytyna - C
- powtórzenie – opcjonalnie, numer powtórzenia biologicznego

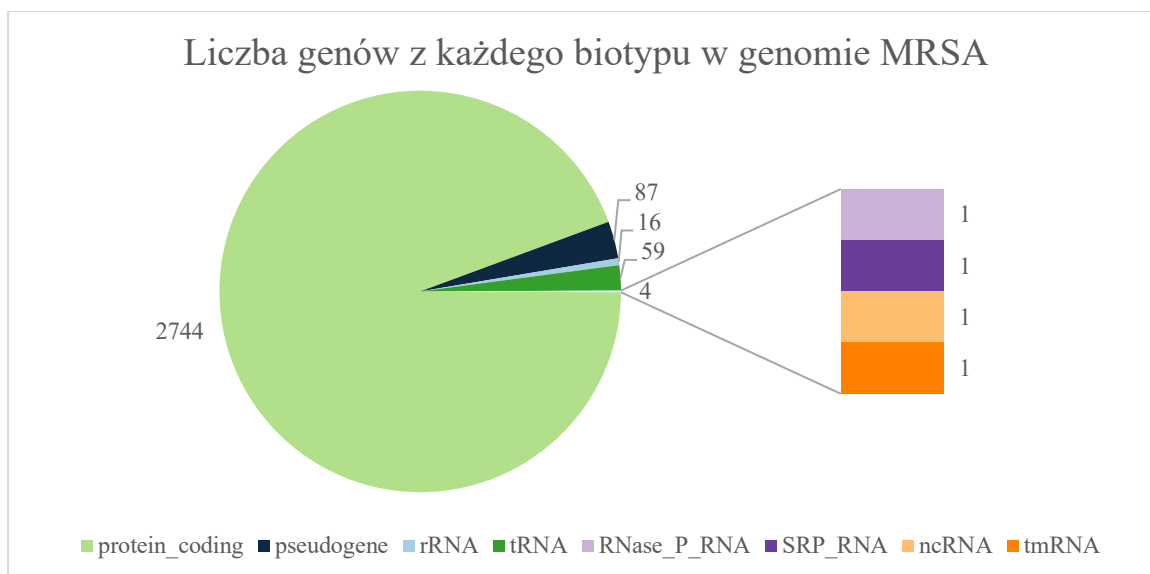
3.2. Szczep bakterii

Szczep wykorzystany do przeprowadzenia hodowli bakteryjnych to *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach Mu50 [NRS1] (<https://www.atcc.org/products/700699>). Wyizolowany został w Japonii z ropy i oczyszczonej tkanki mostka w miejscu nacięcia chirurgicznego u niemowlęcia. Szczep ten jest oporny na metycylinę i oksacylinę oraz wrażliwy na wankomycynę.

Genom bakteryjny i adnotacje genomowe pobrane zostały z bazy danych NCBI RefSeq (Tabela 3). Dodatkowo adnotacje uzupełniono manualnie o sekwencje 5' UTR. Miejsca startu transkrypcji (TSS, *ang. transcription start site*) zidentyfikowane przez Choe i współpracowników w 2018 roku dla genomu *Staphylococcus aureus* USA300 zostały zmapowane do genomu referencyjnego *S. aureus* Rosenbach i wykorzystane jako punkty wyznaczające początek sekwencji 5' UTR. Dla genów, których miejsca startu transkrypcji nie zostały określone, sekwencje 5' UTR zostały wyznaczone jako fragmenty o długości 300 nukleotydów, z możliwością ich skrócenia lub wydłużenia w zależności od odległości względem sąsiednich genów, w tym również tych zlokalizowanych na nici przeciwnej. Dostosowanie długości sekwencji miało na celu ograniczenie nakładania się transkryptów sąsiadujących genów, co pozwalało na ich bardziej precyzyjną identyfikację. Na podstawie dostępnej adnotacji genomowej dokonano zestawienia biotypów dla wszystkich genów w analizowanym genomie (Rycina 4).

Tabela 3. Charakterystyka genomu bakteryjnego użytego do wykonania analiz

NCBI ID	NC_002758
Nazwa	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> Mu50
BioProject	PRJNA224116
BioSample	SAMD00061098
Assembly	GCF_000009665.1
Długość sekwencji	2878529



Rycina 4. Zestawienie liczby genów adnotowanych w każdym z biotypów obecnych w genomie *S. aureus* wykorzystanego do analizy bioinformatycznej

3.3. Wykorzystane antybiotyki

3.3.1. Wankomycyna

Wankomycyna jest antybiotykiem wyizolowanym w 1957 roku przez dr E.C Kornfielda z grzyba *Streptomyces orientalis*. Aktywnie działa przeciwko Gram-dodatnim tlenowym ziarenkowcom i pałeczkom oraz Gram-dodatnim beztlenowcom występującym w jamie ustnej, w tym przeciwko MRSA i skórnej odmianie tego szczepu (MRSE, ang. *methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis*) a także penicylinoopornym *Corynebacterium jeikeium*, *Streptococcus pneumoniae* i *Clostridium difficile*. Wankomycyna jest kluczowym lekiem w leczeniu zakażeń MRSA i MRSE, w tym sepsy, zapalenia wsierdzia i płuc. Jest również stosowana u pacjentów uczulonych na penicyliny i cefalosporyny. Działa bakteriobójczo na większość bakterii Gram-dodatnich, ale wobec enterokoków jest tylko bakteriostatyczna, dlatego często łączy się ją z aminoglikozydami. Wykazuje aktywność przeciwko *Clostridium spp.*, *Peptostreptococcus* i innym beztlenowcom, ale nie działa na pałeczki Gram-ujemne. Pojawienie się w latach osiemdziesiątych szczepów gronkowcowych wrażliwych i następnie opornych na wankomycynę zdeklasowało jej pozycję na liście wszechstronnie działających antybiotyków wśród Gram-dodatnich ziarenkowców. Struktura molekularna wankomycyny to trzycykliczny glikopeptyd

składający się z siedmioczłonowych łańcuchów peptydowych o trójpierścieniowej strukturze i przyłączonego disacharydu składającego się z wankozaminy i glukozy.

Wankomycyna hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii, poprzez oddziaływanie na monomery mureinowe, które są prekursorem peptydoglikanu. Monomery te przyłączane są do peptydoglikanu poprzez transglikozylację, a następnie transpeptydację. Wankomycyna wiąże się z dipeptydami D-Ala-D-Ala monomerów i po przekroczeniu błony komórkowej w tak stworzonym kompleksie powoduje zmiany konformacyjne, które uniemożliwiają działanie glikozylotransferazy budującej łańcuch peptydoglikanowy, co skutkuje przerwaniem syntezy ściany komórkowej. Wankomycyna zazwyczaj powoduje niewielkie działania niepożądane, takie jak zapalenie żył, dreszcze i wysypkę, które wynikają głównie ze sposobu jej podawania. Rzadziej może wywoływać ototoksyczność, objawiającą się szumami usznymi, szczególnie u pacjentów z niewydolnością nerek, u których obserwuje się wysokie stężenia leku w surowicy. Wankomycyna może powodować uszkodzenie nerek, nawet przy prawidłowych poziomach w surowicy, zwłaszcza gdy jest stosowana razem z innymi lekami, takimi jak aminoglikozydy czy cyklosporyna. Ryzyko wzrasta przy dłuższej terapii lub u pacjentów w ciężkim stanie. Długotrwałe stosowanie wankomycyny może także prowadzić do neutropenii, jednak jest to odwracalny efekt, który ustępuje po odstawieniu leku. Powiązано także występowanie małopłytkowości o podłożu immunologicznym, leukocytozy, eozynofilii oraz leukocytoklastycznego zapalenia naczyń ze stosowaniem tego antybiotyku. Szybkie podanie wankomycyny może prowadzić do zespołu „czerwonego człowieka” (RMS, *ang. „red man” syndrome*), który objawia się rumieniem, świądem, niedociśnieniem i obrzękiem naczynioruchowym. Reakcja ta wynika z uwalniania histaminy. Mimo że działania niepożądane wankomycyny są stosunkowo rzadkie, ich ryzyko można zminimalizować poprzez monitorowanie stężenia leku w surowicy oraz dostosowanie szybkości infuzji.

U pacjentów przyjmujących wankomycynę rzadko występuje reakcja anafilaktyczna, ale może to poważna reakcja alergiczna, w tym anafilaksję oraz dermatologiczne schorzenia, takie jak DRESS (wysypka polekowa z eozynofilią i objawami układowymi, *ang. drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*) czy LABD (Liniowa IgA pęcherzowa dermatoza, *ang. linear IgA bullous dermatosis*). Inne ciężkie zmiany skórne obejmują toksyczną nekrolizę naskórka i zespół Stevensa-Johnsona (Levine 2006; Rubinstein & Keynan 2014).

3.3.2. Cefoksytyna

Antybiotyk z klasy beta-laktamowych w podtypie cefalosporyn. W strukturze i mechanizmie działania jest podobny do penicyliny. Rdzeń cząsteczki składa się z czterocząłkowego pierścienia beta-laktamowego, a w odróżnieniu od penicyliny posiada także dodatkowy atom pierścieniu bocznym. Bakterie wrażliwe na penicyliny zwykle są te wrażliwe na cefalosporyny z wyjątkiem gatunków *Listeria* i *Pasteurella* sp. Antybiotyki te aktywnie działają na bakterie Gram-ujemne, a także *Haemophilus influenzae* oraz wrażliwego na metycylinę gronkowca złocistego. Natomiast gronkowiec złocisty oporny na metycylinę wykazuje także oporność na cefalosporyny. Antybiotyki te można podzielić według ich generacji na cztery grupy, z czego ich działanie zmienia ukierunkowanie z bakterii Gram-dodatnich na Gram-ujemne wraz z późniejszą generacją. Cefoksytyna należy do drugiej generacji tych leków, w związku z tym wykazuje mniejszą skuteczność przeciwko *S. aureus*, ale większą skuteczność przeciwko bakteriom beztlenowym niż te z pierwszej generacji. Cefoksytyna wyróżnia się możliwością zwalczania prątków gruźlicy, ale żadna z cefalosporyn drugiej generacji nie działa przeciwko enterokokom, *Pseudomonas*, *S. epidermidis* i wspomnianej już *Listeria* czy gronkowcowi złocistemu opornemu na metycylinę (Harrison & Bratcher 2008).

3.4. Hodowla *Staphylococcus aureus*

Hodowla prowadzona była w laboratorium Zakładu Mikrobiologii UAM dzięki uprzejmości prof. UAM dr hab. Ryszarda Koczury oraz całego zespołu Zakładu na płynnej pożywce MHB (Mueller Hinton Broth) w objętości 60 ml w 37 °C przy delikatnym mieszaniu. Przy OD600 w zakresie 0,18 - 0,23 zawartość wszystkich naczyń hodowlanych została połączona, a następnie rozlana do mniejszych kolb w celu kontynuacji hodowli i uzyskania jednorodnej populacji komórek.

Przy OD600 = 0,45 hodowle podzielono na trzy części. Do prób traktowanych dodano antybiotyki, cefoksytynę (Supelco) oraz wankomycynę (Sigma-Aldrich) do osiągnięcia docelowego stężenia odpowiednio 300 µg/ml oraz 4 µg/ml. Następnie hodowlę prowadzono przez 30 min w warunkach jak powyżej.

3.5. Eksperyment Ribo-seq

Metoda profilowania rybosomowego (Ribo-seq), opracowana przez Ingolia i współpracowników (2009), polega na sekwencjonowaniu fragmentów mRNA chronionych

przez rybosomy w trakcie translacji, co umożliwia analizę aktywnego procesu syntezy białek z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu w warunkach *in vivo*. W eksperymencie tym komórki są traktowane cykloheksamidem w celu zatrzymania rybosomów na mRNA, a następnie poddawane lizie. RNA niezwiązane z rybosomami jest degradowane enzymatycznie (RNazą I), pozostawiając krótkie fragmenty (~28–30 nt) chronione przez rybosomy. Te fragmenty są izolowane, oczyszczane, odwrotnie transkrybowane do cDNA, ligowane z adapterami i amplifikowane, a następnie poddawane sekwencjonowaniu. Dzięki mapowaniu uzyskanych sekwencji względem genomu możliwe jest precyzyjne określenie pozycji rybosomów na transkryptach, identyfikacja regionów genomu kodujących białka, alternatywnych miejsc inicjacji translacji (w tym nie-AUG), oraz analiza efektywności translacji i dynamiki elongacji. Metoda ta pozwala na kompleksową charakterystykę translatomu komórki i ujawnia mechanizmy regulacji translacji, które są niewidoczne przy analizie poziomu mRNA (Ingolia i in. 2009).

Protokół eksperymentalny

Bufor zawieszający

- 250 μ l 1 M MgCl₂ (Thermo Scientific Chemicals) 10 mM
- 125 μ l 1 M CaCl₂ (POL-AURA) 5 mM
- 2,5 ml 1 M NH₄Cl (POL-AURA) 100 mM
- 0,5 ml 1 M Tris (pH 8.0) (Bioshop) 20 mM
- 50 μ l of 0,5 M Cm (Sigma-Aldrich) 1 mM (323 μ g/ml)
- Woda DEPC do 25 ml

Bufor lizujący

- 100 μ l 1 M MgCl₂ (Thermo Scientific Chemicals) 10 mM
- 50 μ l 1 M CaCl₂ (POL-AURA) 5 mM
- 1 ml 1 M NH₄Cl (POL-AURA) 100 mM
- 200 μ l 1 M Tris (pH 8.0) (Bioshop) 20 mM
- 50 μ l 20% IGEPAL CA-630 (Invitrogen) 0,1%
- 200 μ l 20% Triton X-100 (Biopharm) 0,4%
- 10 μ l of 10 U/ μ l RNase-free DNase I (Invitrogen) 100 U/ml
- 25 μ l of 20 U/ μ l SUPERaseIn (Invitrogen) 0.5 U/ μ l
- 20 μ l 0,5 M Cm (Sigma-Aldrich) 1 mM (323 g/ml; Mr = 323 g/mol)
- 1428 μ l of 7X Protease Inhibitors (Roche)
- Woda DEPC do 10 ml

Do bakterii dodano 0,5 M roztwór chloramfenikolu do końcowego stężenia 0,3 mM i inkubowano przez 2 minuty w 37 °C. Następnie umieszczono hodowle na lodzie i do roztworu dodano wcześniej przygotowane zamrożone kostki z chloramfenikolem o stężeniu 100 µg/ml i wymieszano. Tak przygotowane roztwory wirowano (5000 rpm) przez 3 minuty w 4 °C, supernatant usunięto. Osad zawieszono w zimnym buforze zawieszającym. Następnie próbki wirowano jak wcześniej (5000 rpm, 3 min, 4 °C). Supernatant usunięto, a osad zawieszono w zimnym buforze lizującym według proporcji: 600 µl buforu na 100 jednostek OD i inkubowano na lodzie przez 5 minut. Następnie zamrożono próbki w ciekłym azocie w postaci kropelek, umieszczono w falkonach i przechowywano w -80 °C. Tak przygotowane próbki wysłano na suchym lodzie do zespołu dr Olesya Panasenko z uniwersytetu w Genewie (BioCode: RNA to Proteins Core Facility, Dpt of Microbiology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva) w celu wykonania dalszej części protokołu, włączając w to sekwencjonowanie uzyskanego cDNA.

3.6. Eksperyment SHAPE-Map

SHAPE-MaP (*ang. Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling*) to zaawansowana metoda próbkowania struktury RNA, umożliwiająca mapowanie konformacyjnie elastycznych nukleotydów z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu. Technika ta łączy chemiczne modyfikacje RNA z sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym i profilowaniem mutacyjnym, co pozwala na bezpośrednie określenie lokalnej dynamiki strukturalnej RNA. W pierwszym etapie eksperymentu RNA poddawane jest działaniu reagentów SHAPE, takich jak 1M7, które selektywnie reagują z grupami 2'-OH nukleotydów znajdujących się w konformacyjnie elastycznych regionach cząsteczki, np. w regionach niesparowanych. W odróżnieniu od klasycznych metod SHAPE, w których modyfikacje powodują zatrzymanie odwrotnej transkryptazy, SHAPE-MaP wykorzystuje warunki reakcyjne, w których enzym RT odczytuje zmodyfikowane nukleotydy, wprowadzając mutacje w cDNA zamiast przerywać jego syntezę. Powstałe cDNA zawierające mutacje są następnie poddawane sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu. Mutacje są identyfikowane w oparciu o przyrównanie względem sekwencji referencyjnej, a ich częstość jest przeliczana i normalizowana względem próbki kontrolnej. Uzyskane profile reaktywności SHAPE są

następnie wykorzystywane jako dodatkowy wkład energetyczny (pseudo-energia swobodna) w algorytmach predykcji struktury drugorzędowej RNA, takich jak RNAstructure czy ViennaRNA. SHAPE-MaP umożliwia dokładne modelowanie struktur RNA wraz z identyfikacją motywów strukturalnych oraz badaniem alternatywnych konformacji RNA, również w obrębie transkryptów o niskiej ekspresji. Dzięki swojej precyzji, skalowalności i odporności na błędy związane z ligacją czy degradacją RNA, SHAPE-MaP stanowi jedno z najdokładniejszych narzędzi do analizy struktury RNA dostępnych obecnie w biologii molekularnej (Siegfried i in. 2014).

Protokół eksperymentalny

Hodowlę bakteryjną przygotowana zgodnie z opisem w punkcie 3.4 wirowano przez 4 min w 4 °C przy 8000 rpm. Supernatant usunięto. Dla każdego warunku przygotowano 20 ml 24% NaCl (Eurochem BGD) rozpuszczonego w Tris-HCl o pH około 7,5 (BioShop;Chempur) i dodano do osadu. 10ml tego roztworu podzielono na dwie części i dodano 5 U lizostafiny (Sigma-Aldrich) do każdego z nich. Do roztworu będącego próbą kontrolną dodano 0,5 ml DMSO (Sigma-Aldrich) a do roztworu z próbą traktowaną 100 mM 1M7 (Sigma-Aldrich). Inkubowano przez 5 min w 37 °C bez potrząsania. Po tym czasie zwirowano przez 4 minuty w 4 °C przy 8000 rpm. Supernatant usunięto a osad komórek bakteryjnych poddano ekstrakcji RNA.

3.7. Ekstrakcja RNA

Bufor ekstrakcyjny

- 5,9 g izotiocjanianu guanidyny (ROTH)
- 3,8 g izotiocjanianu amonu (ROTH)
- 1,67 ml octanu sodowego pH=5,0 (POL-AURA)
- 5 ml glicerolu (Sigma-Aldrich)
- 100 µl 0,5M EDTA pH=8,0 (POL-AURA)
- 50 µl 2-ME (Sigma-Aldrich)
- Woda DEPC do 31 ml
- 100 µl 10% deoksyholan sodowy (DOC, Eurochem) – dodawany na świeżo przed użyciem

Osad bakteryjny rozpuszczono w 620 µl buforu ekstrakcyjnego i całość przeniesiono do probówek z kulkami. Wytrząsano przez 4 minuty z intensywnością 300/s. Do każdej

próbki dodano 380 μ l fenolu i inkubowano przez 4 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 μ l chloroformu, wymieszano i inkubowano przez 4 minuty. Próbkę zwirowano w 14000rpm przez 1 min. Supernatant przeniesiono na kolumnę Norgen i postępowano według protokołu do izolacji RNA „Total RNA Purification from All Types of Lysate” (NORGEN) wykorzystując odczynniki z zestawu Total RNA Purification Kit – NORGEN Biotek. Procedura opisana została poniżej.

3.8. Oczyszczanie RNA

Wiązanie RNA na kolumnie

Kolumnę wraz zawartością wirowano przez minutę w 6000 rpm w celu przepuszczenia lizatu przez złożę. W przypadku niepełnego przefiltrowania próbki, wirowanie kontynuowano przez dodatkową minutę w 14000rpm. Ciecz, która przepłynęła przez kolumnę usunięto.

Płukanie kolumny

Następnie na kolumnę nałożono 400 μ l roztworu płuczającego (Wash Solution A) i wirowano przez minutę w 14000 rpm. Jeśli całość roztworu płuczającego nie przedostała się przez membranę wirowano przez dodatkową minutę. Ciecz, która przepłynęła usunięto. Procedurę wykonano trzykrotnie dla każdej próby. Następnie kolumny wirowano przez dwie minuty w 14000 rpm by je wysuszyć i pozbyć się wszystkich pozostałości po roztworach.

Elucja RNA

Kolumnę umieszczono w czystej próbce elucyjnej o pojemności 1,7 ml. Dodano 50 μ l roztworu elucyjnego (Elution Solution A) na kolumnę i wirowano przez dwie minuty w 2000 rpm oraz jedną minutę w 14000 rpm. W razie potrzeby wirowano dodatkową minutę. Z każdej próbki wykonano po dwie elucje do osobnych probówek.

3.9. Wytrącanie RNA

Do oczyszczonego RNA dodano 1/9 objętości 3 M octanu sodowego pH=4,5-5,0, 2,5-3 objętości etanolu 96% (Sigma-Aldrich) i 2 μ l glikogenu (POL-AURA). Zmieszano przez lekkie wstrząsanie. Zostawiono w temperaturze -20 °C do następnego dnia.

Kolejnego dnia próbki zwirowano w 12000 rpm przez 40 minut w 4 °C. Usunięto supernatant i dodano 100 μ l 75% etanolu (Sigma-Aldrich), zwirowano przez minutę (12000 rpm, 4 °C), usunięto supernatant i powtórzono przemywanie etanolem. Suszono

otwarte probówki przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Dodano wody i rozpuszczano RNA przez 2 minuty w 65 °C.

Kolejne etapy prac, tj. przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania z eksperymentu SHAPE-MaP, włączając traktowanie DNazą, usuwanie rRNA, odwrotną transkrypcję, oraz syntezę drugiej nici cDNA zostały wykonane przez mgr. Agnieszkę Chełkowską-Pauszek. W celu oczyszczenia wyizolowanego RNA traktowania próbki Turbo DNazą podczas 30 minutowej inkubacji materiału w 37 °C. Po oczyszczeniu próbek z DNazy wykonano reakcję usuwania rRNA z wykorzystaniem zestawu do rybodeplecji NEBNext® rRNA Depletion Kit i postępując zgodnie z protokołem zalecanym przez producentów. Na tak przygotowanym RNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji z użyciem losowych starterów. Parametry reakcji były następujące: 1. inicjacja syntezy cDNA – 10 min, 25 °C; 2. Odwrotna transkrypcja odwrotną transkryptazą SuperScript II – 3 h, 42 °C; 3. dezaktywacja enzymu – 15 min, 70 °C. Następnie oczyszczono powstały cDNA i przystąpiono do syntezy drugiej nici z użyciem zestawu od NEBNext®. Syntezę prowadzono przez 2,5 h w 16 °C. Dwuniciowy DNA oczyszczono z użyciem zestawu PureLink™ PCR Micro Kit, zgodnie z instrukcją producenta.

3.10. Analiza bioinformatyczna

3.10.1. Przygotowanie odczytów do analizy

Wstępna analiza jakości odczytów została wykonana programem FastQC v0.12.1 z domyślnymi ustawieniami (FastQC). Odczyty z eksperymentu SHAPE-MaP oczyszczono z adapterów z wykorzystaniem programu Trimmomatic v0.39 (Bolger i in. 2014). Obliczenia wykonywano na 30 wątkach. Do uruchomienia programu wykorzystano pliki z sekwencjami adapterów z sekwencjonowania Illuminy, które są dostarczane wraz z oprogramowaniem w plikach programowych (TruSeq3-PE.fa, TruSeq3-PE-2.fa) ustawiono parametry przycinania adapterów pozwalając na dwa niedopasowania, wymagając by 30 par zasad nałożyło się z adapterami z obu sparowanych odczytów, oraz by nałożenie jakiejkolwiek sekwencji z adapterem wynosiło minimum 7 par zasad. Zachowano odczyty o długości większej bądź równej 20 par zasad.

Odczyty z eksperymentu Ribo-seq oczyszczono z adapterów wykorzystaniem programu cutadapt (Martin 2011) w wersji 2.8. Obliczenia wykonano na 10 wątkach, z wykorzystaniem sekwencji adaptera CTGTAGGCACCATCAAT i wymuszono by

minimalna liczba nałożonych par zasad pomiędzy sekwencją adaptera a odczytu wynosiła 6, zachowano odczyty o długości pomiędzy 18 a 35 zasad. Wykonano ponowna analiza jakości odczytów po usunięciu nieprawidłowych sekwencji z wykorzystaniem programu FastQC v0.12.1 z domyślnymi ustawieniami.

3.10.2. Mapowanie odczytów do genomu referencyjnego

Mapowanie zostało wykonane programem STAR w wersji 2.7.11a (Dobin i in. 2013), a użyte parametry do zbudowania indeksu genomu oraz samego mapowania przedstawiono w tabelach 4 i 5.

Tabela 4. Parametry programu STAR wykorzystane do zbudowania indeksu genomowego.

<i>Parametr</i>	<i>Wartość</i>	<i>Znaczenie</i>
<i>runMode</i>	genomeGenerate	Tryb uruchomienia programu
<i>runThreadN</i>	10	Liczba wątków dostępnych do obliczeń
<i>genomeDir</i>	XXX/index_star	Ścieżka do indeksu genomu, który ma być utworzony
<i>genomeFastaFiles</i>	genomic.fna	Ścieżka do pliku z sekwencją genomu w formie FASTA
<i>genomeSAindexNbases</i>	9	Długość k-merów, które są używane do wstępnego indeksowania tablicy sufiksowej podczas generowania indeksu genomu, obliczana na podstawie funkcji: $\min(14, \log_2(\text{długość genomu}) / 2 - 1)$
<i>sjdbGTFfile</i>	adnotation_genomic.gtf	Ścieżka do pliku z adnotacjami
<i>sjdbOverhang</i>	49	Długość sekwencji flankującej miejsca splicingowe, obliczana jako długość odczytów-1

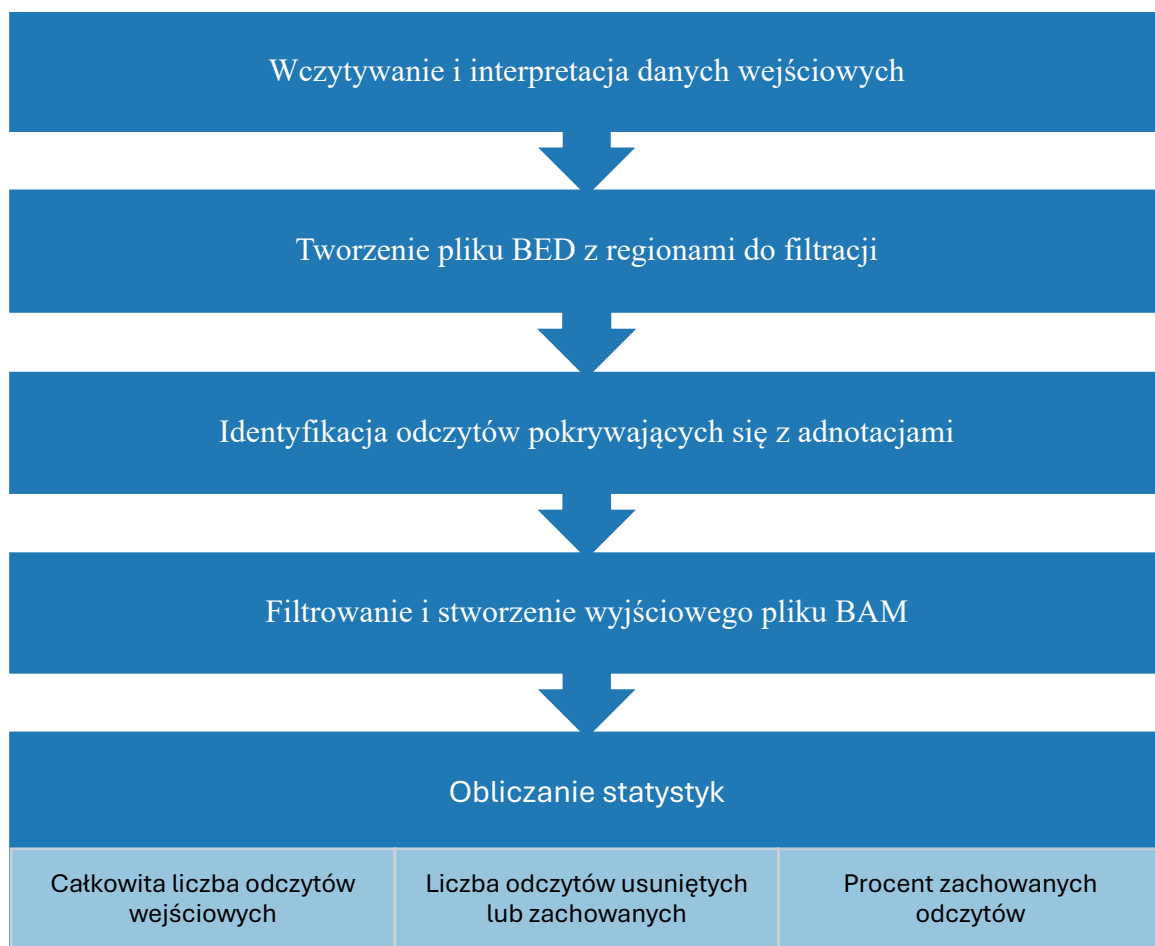
Tabela 5. Parametry programu STAR wykorzystane do mapowania odczytów z eksperymentu Ribo-seq (w nawiasach podano wartości parametrów do użyte do mapowania odczytów z eksperymentu SHAPE-MaP).

<i>Parametr</i>	<i>Wartość</i>	<i>Znaczenie</i>
<i>runThreadN</i>	15 (30)	Liczba wątków dostępnych do obliczeń
<i>genomeDir</i>	XXX/index_star	Ścieżka do indeksu genomu

<i>readFilesIn</i>	XXX/trimmed.fastq (R1.paired.gastq.gz, R2.paired.fastq.gz)	Ścieżka do pliku wejściowego w formacie FASTQ
<i>outFileNamePrefix</i>	mapping/XXX	Ścieżka dla plików wyjściowych
<i>outSAMtype</i>	BAM Unsorted	Format pliku wyjściowego
<i>outSAMattributes</i>	All	Wybór atrybutów, które mają zostać uwzględnione w pliku wynikowym dla mapowanych odczytów
<i>outSAMprimaryFlag</i>	AllBestScore	Wszystkie odczyty z najlepszym wynikiem mapowania traktowane są jako pierwszorzędne
<i>outSAMmultNmax</i>	1	Ogranicza liczbę dopasowań w pliku wynikowym dla odczytów mapujących w kilku miejscach.
<i>outFilterMultimapNmax</i>	1	Maksymalna liczba wielokrotnych dopasowań dla odczytu, wszystkie powyżej traktowane są jako niezmapowane
<i>outFilterScoreMinOverLread</i>	0.7	Minimalny wynik mapowania znormalizowany do długości odczytów.
<i>outFilterMatchNminOverLread</i>	0.7	Minimalna liczba zmapowanych nukleotydów w odczycie znormalizowana do długości odczytów.
<i>outFilterMismatchNmax</i>	4	Maksymalna liczba niedopasowań w parze odczyt-referencja
<i>outFilterMismatchNoverLmax</i>	0.2	Dopasowanie zostanie zwrócone w wynikach tylko jeśli stosunek pozycji niedopasowanych do długości przyrównania jest równy lub mniejszy do podanej wartości
<i>alignIntronMin</i>	1000000000000	Minimalna długość intronu
<i>alignIntronMax</i>	5000000000000000	Maksymalna długość intronu
<i>alignEndsType</i>	EndToEnd (Local)	Rodzaj algorytmu mapowania
<i>quantMode</i>	GeneCounts TranscriptomeSAM	Typ zliczeń obecnych w plikach wynikowych
<i>quantTranscriptomeBan</i>	Singleend	Typ zliczeń transkryptomowych pozwalający na insercje, delecje oraz miękkie przycinanie

Uzyskane pliki BAM zawierające zmapowane odczyty posortowano z użyciem polecenia sort programu Samtools w wersji 1.16.1 (Handsaker i in. 2009).

Wykorzystując genomowe adnotacje usunięto odczyty mapujące do rRNA i tRNA przy użyciu skryptu napisanego w języku Python `filter_BAM_genomic_features.py`, którego schemat działania został przedstawiony na Rycinie 5.



Rycina 5. Schemat przedstawiający główne kroki działania programu do filtrowania zmapowanych odczytów z sekwencjonowania.

Program `filter_BAM_genomic_features.py` to bioinformatyczne narzędzie w języku skryptowym Python napisane przeze mnie na podstawie skryptu o takich samych właściwościach napisanego w języku Perl przez dr hab. Marka Żywickiego. Celem tego narzędzia jest filtrowanie odczytów NGS zapisanych w plikach o formacie BAM na podstawie ich pokrycia z określonymi regionami adnotacji genomowej zapisanymi w formacie GTF. Wykorzystuje w tym celu zestaw narzędzi do analizy danych biologicznych, takich jak Bedtools (Quinlan & Hall 2010) oraz Samtools (wykorzystane do analizy wersje tych programów to odpowiednio 2.27.1 i 1.16.1). Pierwszym krokiem w działaniu skryptu

jest wczytanie argumentów wejściowych, które definiują parametry filtrowania. Użytkownik określa, czy odczyty pokrywające się z regionami adnotacji mają być usunięte (1) czy zachowane (0), wskazuje tryb analizy (genomiczny lub transkryptomiczny), podaje listę cech adnotacji, które mają zostać odfiltrowane, a także ścieżki do plików GTF i BAM oraz nazwę dla pliku wynikowego BAM. Program sprawdza poprawność podanych argumentów i zapewnia ich właściwe wczytanie, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzenie dalszej analizy bez błędów wynikających z niepoprawnie sformatowanych danych wejściowych. Następnie skrypt przechodzi do etapu tworzenia pliku BED z regionami genomowymi, które mają zostać użyte do filtrowania. Aby to osiągnąć, program wyodrębnia odpowiednie cechy adnotacji z pliku GTF, wykorzystując polecenie `grep` i zapisuje w pliku BED współrzędne chromosomowe w formacie `nazwa_chromosomu pozycja_start pozycja_stop`. Po przygotowaniu pliku BED program przechodzi do identyfikacji odczytów BAM, które pokrywają się z wyznaczonymi regionami adnotacji. Wykorzystuje do tego narzędzie `Bedtools intersect`, które pozwala na znalezienie wszystkich odczytów, które nakładają się na wcześniej określone regiony genomowe. Każdy zidentyfikowany odczyt zostaje zapisany w strukturze danych, dzięki czemu możliwe jest jego późniejsze zachowanie lub usunięcie z pliku wynikowego BAM w zależności od użytego trybu. Ostatnim kluczowym etapem jest przetwarzanie pliku BAM w celu zapisania tylko tych odczytów, które spełniają kryteria filtrowania. W tym celu program wykorzystuje polecenie `Samtools view`, które pozwala na strumieniowe odczytywanie danych BAM i ich selekcję. Program iteruje przez każdy odczyt BAM i sprawdza jego obecność w zbiorze zawierającym odczyty pokrywające się z regionami adnotacji. W trybie usuwania konkretnych cech ze zbioru, wszystkie odczyty pokrywające się z regionami adnotacji są usuwane. Jeśli wybrano tryb znalezienia genów mapujących do danych cech, program zachowuje jedynie odczyty, które pokrywają się z adnotacjami. Program zapisuje przefiltrowane odczyty do nowego pliku BAM. Po zakończeniu filtrowania program oblicza statystyki, w tym całkowitą liczbę odczytów w pliku BAM przed filtrowaniem, liczbę odczytów usuniętych lub zachowanych oraz procent zachowanych odczytów w stosunku do całości. Wyniki te są prezentowane użytkownikowi, pozwalając na ocenę skuteczności filtrowania oraz jego wpływu na jakość danych. Do przeprowadzonej analizy wykorzystano tryb genomiczny usunięcia odczytów nakładających się na cechy adnotowane jako rybosomalne i transportujące RNA.

3.10.3. *Przygotowanie plików do analizy różnicowej*

Program STAR poza plikami wynikowymi ze zmapowanymi odczytami generuje także kilka plików zawierających podsumowanie mapowania w tym plik ze zliczeniami odczytów mapujących do konkretnych genów – ReadsPerGene.out.tab.

W celu wygenerowania macierzy zliczeń na podstawie wyników eksperymentów RNA-seq oraz RIBO-seq opracowano skrypt w języku Python, który przetwarza dane otrzymane w wyniku mapowania programem STAR. Dane wejściowe znajdują się w dwóch odrębnych katalogach dla próbek RNA-seq oraz dla próbek RIBO-seq. Skrypt wykorzystuje funkcję `get_counts()`, która iteruje po plikach znajdujących się w podanym katalogu, identyfikuje pliki zawierające liczby odczytów przypisanych do genów, a następnie dla każdego genu odczytuje odpowiednie wartości zliczeń przypisane do próbki i zachowuje je w strukturze słownika. W sytuacji, gdy dany gen nie wykazuje aktywności w konkretnej próbce i nie ma wartości zliczeń przypisuje się wartość zero. Tak przygotowana struktura danych pozwala na wygenerowanie macierzy ekspresji w formacie CSV za pomocą funkcji `get_output()`, która przekształca dane do formy tabelarycznej, wypisując nazwy genów w wierszach oraz identyfikatory próbek w nagłówku kolumnowym.

Ostatecznie skrypt zapisuje dwie osobne macierze zliczeń w postaci plików CSV, zawierających odpowiednio dane dla zestawu próbek RNA-seq oraz próbek RIBO-seq. Tak przygotowane pliki stanowią punkt wyjścia do dalszej analizy bioinformatycznej, umożliwiającej m.in. normalizację danych, porównanie transkryptomu i translatomu oraz identyfikację zmian w regulacji translacyjnej.

W celu identyfikacji typów biologicznych genów zawartych w genomie Rosenbach opracowano dedykowany skrypt w języku Python. Skrypt przetwarza plik adnotacji genomowych w formacie GTF, zawierający informacje o lokalizacji i atrybutach genów. Analiza rozpoczyna się od iteracyjnego przeglądania zawartości pliku wejściowego. Dla każdej linii opisującej gen, atrybuty zawarte w ostatniej kolumnie są dzielone na poszczególne pary klucz–wartość i na tej podstawie przypisywane są do genu dwie wartości: unikalny identyfikator oraz typ biologiczny. Dane te przechowywane są w strukturze słownika, zapewniając, że każdy gen zostanie uwzględniony tylko raz. Następnie wartości te zostają zapisane do pliku CSV w formie tabeli z dwiema kolumnami: pierwsza zawiera identyfikator genu, a druga przypisany do niego typ biologiczny (np.

protein_coding, lncRNA, pseudogene). W efekcie powstaje skondensowana tabela klasyfikacji funkcjonalnej genów.

W celu ograniczenia dalszej analizy transkryptomicznej i translatomicznej do genów kodujących białka przefiltrowano macierze zliczeń RNA-seq oraz RIBO-seq wykorzystując wcześniej stworzoną tabelę klasyfikacji funkcjonalnej genów. Opracowano skrypt w języku Python, który z tej tabeli wyodrębnia jedynie te geny, które zostały zaklasyfikowane jako „protein_coding”. Następnie otwiera pliki macierzy zliczeń i iteracyjnie przeszukuje ich zawartość. Wiersze odpowiadające genom zaklasyfikowanym jako kodujące białka zapisuje do nowych plików wyjściowych osobno dla każdego z eksperymentów. Wiersze zawierające inne typy genów zostają pominięte. Nagłówek zostaje zachowany bez zmian.

Tak przygotowane zbiory danych zawierają wyłącznie profile ekspresji genów kodujących białka i są wykorzystywane w dalszych etapach analizy różnicowej, funkcjonalnej (np. wzbogacenie GO) oraz integracyjnej dane RNA-seq i Ribo-seq.

3.10.4. *Analiza różnicowej ekspresji genów kodujących białka metodą NOISeq*

W celu identyfikacji genów kodujących białka o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy warunkami eksperymentalnymi przeprowadzono analizę danych RNA-seq z wykorzystaniem pakietu NOISeq w wersji 2.38.0 (Tarazona i in. 2011) w środowisku R. Wybrano pakiet NOISeq ze względu na jego funkcjonalność umożliwiającą symulację powtórzeń biologicznych. Analiza obejmowała próbki traktowane cefoksytyną, wankomycyną oraz próbkę kontrolną.

Wcześniej przygotowane zliczenia dla danych z RNA-seq ograniczonych do genów kodujących białka, znormalizowano metodą odciętej średniej wartości M (TMM, *ang. Trimmed Mean of M-values*) przy użyciu funkcji calcNormFactors() z pakietu edgeR (Robinson i in. 2010). Znormalizowane wartości zliczeń zostały przekształcone do postaci CPM (*ang. Counts Per Million*), zarówno w wersji logarytmicznej, jak i bez logarytmizacji. W celu przygotowania danych do analizy, zastosowano funkcję readData() z pakietu NOISeq, uwzględniając typ biotypu dla każdego genu. Na podstawie przygotowanych obiektów danych przeprowadzono wstępną eksplorację jakościową, obejmującą analizę rozkładu zliczeń, wykrywalność biotypów, analizę głównych składowych (PCA, *ang.*

Principal Component Analysis), a także wygenerowanie raportu diagnostycznego jakości danych.

Różnice ekspresji pomiędzy parami warunków (cefoksytyna vs kontrola, wankomycyna vs kontrola, cefoksytyna vs wankomycyna) oceniono metodą `noiseg()` bez powtórzeń biologicznych (`replicates = "no"`), z parametrami zgodnymi z zaleceniami pakietu (`k = 0.1`, `pnr = 0.2`, `nss = 5`, `v = 0.02`, `lc = 1`). Następnie, dla każdego porównania z wykorzystaniem funkcji `degenes()` wyodrębniono zestawy genów ulegającym ekspresji różnicowej przy poziomach istotności $q \geq 0.95$, rozdzielając je dodatkowo na geny ulegające podwyższonej oraz obniżonej ekspresji. Wykonano wizualizację wyników analizy różnicowej ekspresji w formie wykresów MD (*ang. Mean-Difference*). Wyniki analizy zostały zapisane w plikach o formacie CSV.

3.10.5. *Analiza zmienności translacyjnej genów kodujących białka*

W celu identyfikacji genów z istotną zmiennością w poziomie translacji przeprowadzono analizę analogiczną do analizy opisanej w punkcie 3.10.4 z wykorzystaniem pakietu NOISeq w środowisku R dla danych z eksperymentu RIBO-seq.

3.10.6. *Analiza zmienności efektywności translacji*

W celu kompleksowej analizy mechanizmów regulacji translacji w odpowiedzi na działanie antybiotyków przeprowadzono analizę efektywności translacji dla trzech warunków eksperymentalnych: kontrola (bez antybiotyku), wankomycyna oraz cefoksytyna. Dane wejściowe obejmowały przygotowane zgodnie z punktem 3.10.3 zliczenia dla genów kodujących białka z eksperymentu RNA-seq oraz Ribo-seq.

Najpierw zsumowano zliczenia w powtórzeniach biologicznych dla danych RIBO-seq, uzyskując zintegrowane wartości dla każdej z prób biologicznych. Zliczenia z obu eksperymentów znormalizowano przy użyciu metody TMM (funkcja `calcNormFactors` z pakietu `edgeR`) i przekształcone do postaci CPM. Następnie na podstawie wspólnej listy genów połączono dane w jedną tabelę i odfiltrowano wiersze, w których występowały zerowe wartości CPM.

Na podstawie znormalizowanych danych CPM obliczono wartości efektywności translacji (TE, *ang. Translation Efficiency*) genów jako stosunek sygnału RIBO-seq do RNA-seq dla każdego z warunków: kontrola (TE_k), wankomycyna (TE_w) oraz cefoksytyna (TE_c). W

kolejnym etapie dokonano oceny jakości danych TE przy użyciu funkcji diagnostycznych pakietu NOISeq analogicznie jak w punkcie 3.10.4.

Na podstawie wartości efektywności translacji wyznaczono krotność jej zmiany (FC, *ang. fold change*) w postaci logarytmicznych stosunków efektywności translacji $\log_2(\text{TEwarunek1}/\text{TEwarunek2})$. Analizę statystyczną różnicowej efektywności translacji wykonano metodą NOISeq bez powtórzeń biologicznych (*replicates = "no"*), stosując parametry domyślne *pnr = 0.2*, *nss = 5*, *v = 0.02*, *lc = 1*, dla wszystkich kombinacji warunków eksperymentalnych. Geny o istotnie zmienionej efektywności translacji (przy poziomie istotności $q \geq 0.95$) zostały wyodrębnione za pomocą funkcji *degenes()*. Wykonano wizualizację wyników analizy różnicowej efektywności translacji w formie wykresów MD (*ang. Mean-Difference*). Wyniki analizy zostały zapisane w plikach o formacie CSV.

3.10.7. *Analiza danych SHAPE-MaP*

W celu uzyskania profili reaktywności strukturalnej RNA odczyty z sekwencjonowania bibliotek SHAPE-MaP przetworzono programem *mars-probe* (publikacja w przygotowaniu) wykorzystującym uczenie maszynowe w celu ustalenia wartości reaktywności dla poszczególnych nukleotydów w transkryptach. Program *mars-probe* został opracowany przez mgr. Remigiusza Gębkę z Zakładu Biologii Obliczeniowej UAM, który wykonał też poniższe analizy. Dane z eksperymentów SHAPE-MaP zostały przetworzone w kilku etapach: najpierw surowe odczyty sekwencjonowania poddano identyfikacji i zliczeniu mutacji w pozycjach modyfikowanych, wykorzystując komponent analityczny programu *ShapeMapper* (Busan & Weeks 2018). Następnie dane zostały przekształcone w zestawy cech opisujących lokalną reaktywność chemiczną oraz kontekst sekwencyjny sąsiadujących nukleotydów. Tak przygotowane wektory cech posłużyły jako wejście do modeli predykcyjnych opartych na algorytmach uczenia maszynowego, które estymują prawdopodobieństwo występowania nukleotydów niesparowanych, wspierając dalsze modelowanie struktury drugorzędowej RNA.

3.10.7.1. *Przygotowanie plików do analizy danych strukturalnych*

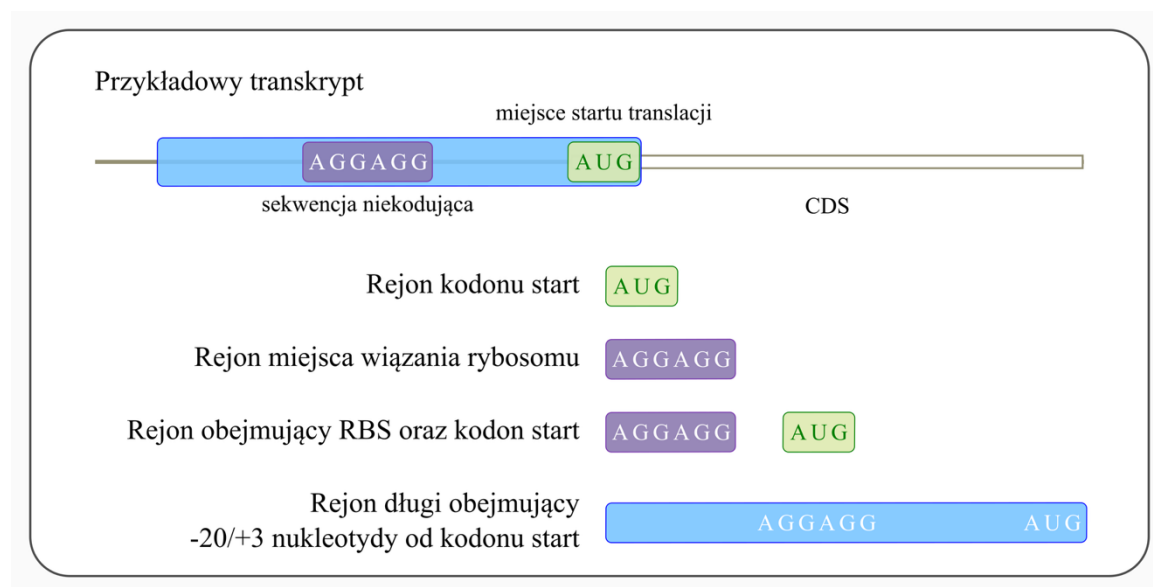
Opracowano skrypt w języku R w celu przetworzenia danych dotyczących reaktywności RNA w trzech warunkach eksperymentalnych: kontrola (K), cefoksytyna (C) oraz wankomycyna (W). Analiza została przeprowadzona na wynikach wygenerowanych przy

użyciu metody analizy danych strukturalnych i translatomowych opisanej w niniejszej rozprawie w podrozdziale 4.1.5 dla każdej pary warunków eksperymentalnych (K vs C, K vs W, C vs W). Z plików wejściowych pobrano wartości reaktywności dla każdego genu w pozycjach RBS, kodonu start oraz rozszerzonego obszaru wokół kodonu start, który obejmował -20/+3 nukleotydy od licząc od pierwszego nukleotydu kodonu start. Dane wejściowe przekształcono tak, by ostateczny zbiór danych reprezentował pełen zakres pozycji nukleotydowych z wymienionych obszarów dla wszystkich genów w trzech warunkach eksperymentalnych. Dane te zapisano w formie tabeli w pliku CSV, który stanowi punkt wyjścia do dalszych analiz statystycznych i wizualizacji reaktywności RNA w różnych warunkach biologicznych. Do uzyskania powyższych rezultatów wykorzystano podstawowe biblioteki do manipulacji danymi: dplyr (Wickham i in. 2025), tidyr (Wickham i in. 2025), readr (Wickham i in. 2024), stringr (Wickham 2023).

3.10.7.2. Porównawcza analiza dostępności strukturalnej RNA w wybranych regionach transkryptów bakteryjnych w warunkach ekspozycji na cefoksytynę i wankomycynę

Kolejnym etapem była analiza różnic reaktywności RNA między trzema warunkami eksperymentalnymi: kontrola (K), cefoksytyna (C) oraz wankomycyna (W). W tym celu napisano skrypt w języku Python, do którego dane wejściowe przygotowano zgodnie z opisem w podrozdziale 3.10.7.1. Na potrzeby analizy dane te zostały podzielone na cztery podzbiory odpowiadające biologicznie istotnym regionom przedstawionym na rycinie 6: rejon długi, obejmujący nukleotydy otaczające kodon startowy (-20/+3 nt), rejon wiążący rybosom (RBS), kodon startowy, oraz syntetyczny rejon powstały z połączenia RBS z kodonem startowym (Rycina 6). Dla każdego z czterech regionów wykonywano analizę różnicową dostępności strukturalnej obejmująca pary warunków eksperymentalnych: K vs C, K vs W oraz C vs W. Analiza rozpoczyna się od wykonania testu t-Studenta dla wartości reaktywności z konkretnego regionu dla pary warunków. Obliczenia wykonywane są dla każdego genu w obrębie wszystkich czterech rejonów. Na tej podstawie obliczana jest wartość p (*ang. p-value*) oraz klasyfikacja istotności statystycznej różnic w reaktywności danego rejonu pomiędzy warunkami ($p\text{-value} < 0.05$). Równolegle obliczane są dodatkowe statystyki: średniej reaktywności w obu warunkach, różnica średnich z obu warunków oraz średnia ogólna dla obszaru (różnica średnich z obu warunków podzielona na dwa). Wyniki te są zapisywane w formie tabelarycznej do osobnych plików CSV dla każdego regionu. Tak przygotowane dane stanowią punkt wyjściowy do wizualizacji otrzymanych statystyk.

Dla każdej pary warunków w obrębie danego regionu generowane są dwa typy wykresów: wykres różnic istotnych (*ang. volcano plot*).



Rycina 6. Rejony mRNA istotne w fazie inicjacji translacji wyselekcjonowane do analizy strukturalnej. Rejon kodonu start (3 nt), rejon wiążący rybosom (5 nt), rejon obejmujący zarówno RBS jak i kodon start (8 nt) oraz rejon długi, obejmujący nukleotydy otaczające kodon startowy (-20/+3 nt od pierwszego nukleotydu kodonu start).

3.10.8. Zintegrowana analiza danych strukturalnych i translatomowych

W celu integracji profili reaktywności nukleotydów poszczególnych transkryptów oraz efektywności ich translacji stworzono metodę, opisaną w rozdziale czwartym (4.1.6) – Wyniki, niniejszej rozprawy. Metoda ta wykorzystuje do działania narzędzie RBSfinder (Suzek i in. 2001), stanowiące probabilistyczny system wspomagający identyfikację miejsc inicjacji translacji w genomach bakterii. Jego głównym celem jest poprawa dokładności lokalizacji kodonów startowych, poprzez wykrywanie miejsc wiązania rybosomu w regionach 5' mRNA. RBSfinder działa jako moduł, który analizuje wyniki klasycznych narzędzi do predykcji genów, takich jak Glimmer (Delcher i in. 1999) czy GeneMark.hmm (Lukashin & Borodovsky 1998), i weryfikuje lokalizację kodonów startowych na podstawie obecności sekwencji RBS. Algorytm wykorzystuje fakt, że w większości bakterii sekwencja RBS jest komplementarna do końca 3' rRNA 16S, najczęściej w postaci motywu Shine–Dalgarno (np. AGGAGG), zlokalizowanego około 8–10 nukleotydów przed kodonem startowym. Proces analizy rozpoczyna się od wygenerowania tzw. sekwencji inicjującej (*ang. seed sequence*), która służy do trenowania modelu probabilistycznego. Jeśli znana jest sekwencja 16S rRNA danego organizmu, jej końcowy

fragment jest wykorzystywany jako źródło sekwencji inicjującej. Następnie algorytm przeszukuje regiony poprzedzające kodony startowe i identyfikuje najbardziej prawdopodobne miejsca wiązania rybosomu na podstawie podobieństwa do sekwencji inicjującej. Zidentyfikowane sekwencje RBS są oceniane pod kątem siły wiązania (np. liczby wiązań wodorowych) oraz pozycji względem kodonu AUG. Na tej podstawie RBSfinder wybiera najbardziej prawdopodobny kodon startowy dla danego genu, co pozwala na korektę błędnych predykcji i znalezienie wcześniej nieadnotowanych kodonów start. RBSfinder został przetestowany na zestawie zweryfikowanych genów *Escherichia coli*, gdzie poprawił trafność lokalizacji kodonów startowych z poziomu 67–77% (dla klasycznych narzędzi) do około 90% (Suzek i in. 2001).

3.10.9. *Analiza funkcjonalna wybranych genów*

W celu wykonania analizy funkcjonalnej wybranych genów stworzono listę ich unikalnych identyfikatorów i na podstawie adnotacji genomowych dopasowano odpowiadające im identyfikatory białkowe w notacji RefSeq. Następnie listę identyfikatorów białek poddano konwersji na identyfikatory białkowe w notacji UniProtKB z wykorzystaniem narzędzia online ID mapping UniProt (Zaru i in. 2023). Narzędzie zwraca listę wybranych identyfikatorów zmapowanych wśród różnych organizmów oraz dodatkowo wybrane identyfikatory GO – proces biologiczny, funkcja molekularna, komponent komórkowy. Z otrzymanej tabeli wybrano tylko te identyfikatory białkowe, które przypisane były do genomu *Staphylococcus aureus* Mu50.

3.10.10. *Wizualizacja wyników*

Wszystkie wykresy ilustrujące wyniki otrzymane podczas analizy danych SHAPE-MaP oraz Ribo-seq zostały wykonane przy użyciu języków Python oraz R w oparciu o dostępne biblioteki do analizy bioinformatycznej oraz wizualizacji takie jak: numpy (Harris i in. 2020), pandas (McKinney 2010), scipy (Virtanen i in. 2020), matplotlib (Hunter 2007), seaborn (Waskom 2021), sklearn (Pedregosa i in. 2011) dla Pythona oraz dplyr (Wickham i in. 2025), tidyr (Wickham i in. 2025), readr (Wickham i in. 2024), stringr (Wickham 2023) w R.

4. WYNIKI I DYSKUSJA

W ramach eksperymentów SHAPE-MaP oraz Ribo-seq otrzymano biblioteki odczytów z NGS przygotowanych na podstawie RNA wyizolowanego z komórek *Staphylococcus aureus*. W przypadku SHAPE-MaP uzyskano próbki z wykorzystaniem odczynnika SHAPE, oraz próbki niepoddane modyfikacji traktowano jako równoważne z klasycznym RNA-seq i wykorzystywano jako odniesienie dla wszystkich eksperymentów. Ze względu na metodę sekwencjonowania sparowanych końców w przypadku danych SHAPE-MaP, dla każdej z próbek wygenerowane zostały dwa pliki, obejmującą odczyty w obu kierunkach (forward 5' → 3' i reverse 3' → 5'). Eksperymenty przeprowadzono w trzech warunkach hodowlanych: kontrolnym, bez dodatku substancji aktywnych oraz dwóch wariantach traktowanych, w których bakterie eksponowano oddzielnie na działanie antybiotyków — wankomycyny i cefoksytyny. W ramach eksperymentu przygotowano dziewięć bibliotek Ribo-seq, po trzy dla każdego z trzech warunków hodowlanych, z zachowaniem powtórzeń biologicznych.

4.1.1. Charakterystyka uzyskanych danych sekwencyjnych

W pierwszym etapie analizy przeprowadzono ocenę jakości i charakterystykę odczytów programem FastQC. We wszystkich próbkach odczyty zostały oznaczone jako dobrej jakości, a także zawierały sekwencje adapterowe i wysoki poziom sekwencji zduplikowanych, średnio 75% duplikatów w eksperymentach SHAPE-MaP oraz 95% w eksperymentach Ribo-seq. W większości próbek z eksperymentów strukturalnych zidentyfikowano nieprawidłowości przy parametrach dotyczących zawartości poszczególnych zasad w sekwencjach, zawartości zasad GC oraz nadreprezentowanych sekwencji. W próbkach z eksperymentów Ribo-seq parametry związane z zawartością poszczególnych zasad w sekwencjach, zawartością zasad GC oraz poziomem sekwencji występujących wielokrotnie nie spełniły kryteriów jakości. Dane dotyczące liczby oraz długości sekwencji w poszczególnych próbkach zamieszczono w tabelach 6-8.

Tabela 6. Profil surowych odczytów RNA-seq. Pliki z odczytami forward i reverse opisane są wspólnie dla każdej próbki ze względu na takie same statystyki występujące w obu plikach.

Próbka	Liczba surowych par odczytów	Długość sekwencji	%GC	Warunek
RNA-K	436 504 466	150	36	kontrola
RNA-W	343 611 830	150	35	wankomycyna
RNA-C	247 665 956	150	37	cefoksytyna

Tabela 7. Profil surowych odczytów SHAPE-MaP. Pliki z odczytami forward i reverse opisane są wspólnie dla każdej próbki ze względu na takie same statystyki występujące w obu plikach.

Próbka	Liczba surowych par odczytów	Długość sekwencji	%GC	Warunek
SHAPE-K	434 986 833	150	36	kontrola
SHAPE-W	393 785 735	150	36	wankomycyna
SHAPE-C	368 588 378	150	36	cefoksytyna

Tabela 8. Profil surowych odczytów Ribo-seq.

Próbka	Liczba surowych odczytów	Długość sekwencji	%GC	Warunek
RIBO-K1	95 133 512	100	51	kontrola
RIBO-K2	91 074 144	100	54	kontrola
RIBO-K3	70 884 377	100	51	kontrola
RIBO-W1	98 525 473	100	51	wankomycyna
RIBO-W2	40 973 610	100	51	wankomycyna
RIBO-W3	86 667 089	100	52	wankomycyna
RIBO-C1	47 807 225	100	52	cefoksytyna
RIBO-C2	93 442 770	100	50	cefoksytyna
RIBO-C3	93 168 447	100	52	cefoksytyna

Zgodnie z danymi przedstawionymi w tabelach 6–8, liczba odczytów Ribo-seq jest zauważalnie niższa niż w RNA-seq oraz SHAPE-MaP. Średnia liczba odczytów w próbach kontrolnych uzyskanych metodą Ribo-seq jest pięciokrotnie niższe niż w przypadku RNA-seq i SHAPE-MaP. W próbach traktowanych wankomycyną pokrycie Ribo-seq jest odpowiednio 4,5 razy niższe względem RNA-seq oraz 5 razy niższe względem SHAPE-MaP. Natomiast w próbach traktowanych cefoksytiną pokrycie Ribo-seq jest trzykrotnie niższe niż w RNA-seq i blisko pięciokrotnie niższe (4,7 razy) niż w SHAPE-MaP. Tak wyraźna różnica w głębokości sekwencjonowania wynika z charakteru eksperymentu SHAPE-Map, w którym analiza danych opiera się o identyfikacje mutacji spowodowanych adduktami chemicznymi, występujących zazwyczaj z częstością poniżej 1%. Tak niska częstotliwość wymusza wyjątkowo głębokie sekwencjonowanie bibliotek w celu zapewnienia nadzwyczaj wysokiego pokrycia transkryptów odczytami (około 400 mln par odczytów na próbkę, zakładane średnie pokrycie odczytami transkryptomu *S. aureus*: >16 000 X). Ponadto w przypadku Ribo-seq, enzymatyczne trawienie RNA może prowadzić do utraty części materiału. Liczby odczytów uzyskane w próbkach uznano za optymalne do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej.

Następnie w ramach wstępnego przetwarzania danych przeprowadzono oczyszczenie plików surowych w celu eliminacji niskiej jakości odczytów oraz sekwencji technicznych. Z odczytów usunięto sekwencje adaptorowe oraz dokonano selekcji według długości i jakości. Dla zestawu danych SHAPE-MaP i RNA-seq zastosowano program Trimmomatic, a dla danych pochodzących z eksperymentów Ribo-seq wykorzystano program Cutadapt. Program Trimmomatic umożliwił skuteczne usunięcie sekwencji o obniżonych parametrach jakościowych, pozostawiając wystarczającą liczbę odczytów do przeprowadzenia dalszych analiz strukturalnych oraz porównawczych na poziomie transkryptomu (Tabela 9 i 10). W danych z profilowania rybosomalnego, zgodnie z oczekiwaniami, zdecydowana większość odczytów zawierała sekwencje adapterowe. Po ich wycięciu zachowano średnio 67% odczytów, których długości mieściły się w zakresie charakterystycznym dla analiz Ribo-seq, co potwierdza wysoką jakość uzyskanego materiału do dalszego profilowania translacyjnego (Tabela 11).

Tabela 9. Podsumowanie wyników działania programu Trimmomatic dla danych SHAPE-MaP.

Próbka	Liczba wejściowych par odczytów	Liczba zachowanych par odczytów	Procent zachowanych par odczytów
SHAPE-K	434 986 833	309 491 080	71,14%
SHAPE-W	393 785 735	282 217 036	71,67%
SHAPE-C	368 588 378	272 766 108	74,00%

Tabela 10. Podsumowanie wyników działania programu Trimmomatic dla danych RNA-seq

Próbka	Liczba wejściowych par odczytów	Liczba zachowanych par odczytów	Procent zachowanych par odczytów
RNA-K	436 504 466	329 352 335	75,45%
RNA-W	343 611 830	271 993 250	79,16%
RNA-C	247 665 956	161 546 232	65,23%

Tabela 11. Podsumowanie wyników działania programu Cutadapt dla danych Ribo-seq.

Próbka	Liczba surowych odczytów	Liczba zachowanych odczytów	Procent odczytów zawierających adapter	Procent zachowanych odczytów
RIBO-K1	95 133 512	50 736 131	98,2%	53,3%
RIBO-K2	91 074 144	35 716 486	98,2%	39,2%
RIBO-K3	70 884 377	47 057 577	98,4%	66,4%
RIBO-W1	98 525 473	77 927 706	98,5%	79,1%
RIBO-W2	40 973 610	33 768 841	98,9%	82,4%
RIBO-W3	86 667 089	66 409 344	98,5%	76,6%
RIBO-C1	47 807 225	34 735 857	98,7%	72,7%
RIBO-C2	93 442 770	72 492 394	98,3%	77,6%
RIBO-C3	93 168 447	51 317 823	98,4%	51,1%

Oczyszczone próbki poddano ponownej analizie programem FastQC w celu sprawdzenia efektywności poprzednich etapów. W próbkach z danych Ribo-seq odczyty miały długość od 18 do 35 nukleotydów i średnią zawartość zasad GC na poziomie 56%. W próbkach z danych SHAPE-MaP oraz RNA-seq długość odczytów wahała się pomiędzy 20 a 150 nukleotydami, a średnia zawartość GC w sekwencjach wynosiła 34%. Ocena jakości danych uzyskanych metodami Ribo-seq, RNA-seq oraz SHAPE-MaP wykazała wysoką jakość parametrów technicznych, takich jak jakość sekwencjonowania na poziomie pojedynczych zasad, jakość na poziomie płytki, ogólna ocena sekwencji oraz zawartość niezidentyfikowanych zasad (N), zarówno przed, jak i po oczyszczeniu danych. W przypadku wszystkich trzech metod nie zaobserwowano poprawy w zakresie poziomu duplikacji sekwencji, zawartości zasad w poszczególnych pozycjach oraz obecności nadreprezentowanych sekwencji, co może wynikać z charakterystyki bibliotek — w Ribo-seq z ograniczonej długości rybosomowo chronionych fragmentów, a w RNA-seq i SHAPE-MaP z nadmiernej amplifikacji transkryptów o wysokiej ekspresji. Rozkład długości sekwencji pogorszył się we wszystkich próbkach (z dobrej do umiarkowanej jakości), co jest technicznie spodziewanym efektem działania programów oczyszczających (Cutadapt dla Ribo-seq, Trimmomatic dla RNA-seq i SHAPE-MaP), które przycinają odczyty i usuwają fragmenty o niskiej jakości. Najbardziej jednoznaczną i spójną poprawę jakości danych zaobserwowano we wszystkich trzech metodach w zakresie zawartości sekwencji adapterowych — jakość tego parametru zmieniła się z nieakceptowalnej na dobrą, co potwierdza skuteczność zastosowanych procedur filtracji i przygotowuje dane do dalszego mapowania oraz analizy.

Następnie odczyty zmapowano do genomu *S. aureus* Mu50 z wykorzystaniem programu STAR (Dobin i in. 2013). Podsumowanie wyników tego etapu przedstawiono w tabelach 12, 13 i 14. Przedstawione dane obrazują skuteczność mapowania sekwencji uzyskanych w trzech kluczowych eksperymentach: sekwencjonowania RNA techniką RNA-seq, chemicznego profilowania struktury mRNA metodą SHAPE-MaP oraz profilowania aktywności translacyjnej mRNA techniką Ribo-seq. W celu zapewnienia wysokiej jakości wyników oraz spójności pomiędzy analizami strukturalnymi, kontrolnymi i translacyjnymi, do dalszego etapu badań uwzględniono wyłącznie odczyty mapujące unikalnie.

Podejście to eliminuje wpływ sekwencji mapujących w wiele miejsc genomu, które mogłyby prowadzić do niejednoznacznej interpretacji lokalizacji aktywnej translacji oraz zaburzenia odczytu poziomu translacji wybranych transkryptów. W kontekście analizy

ryboprzełączników translacyjnych oraz strukturalnych regulatorów RNA, precyzyjna lokalizacja zmian konformacyjnych i aktywności translacyjnej ma kluczowe znaczenie dla identyfikacji funkcjonalnych zależności molekularnych.

Tabela 12. Podsumowanie wyników mapowania odczytów z eksperymentu SHAPE-MaP.

Próbka	Liczba par odczytów wejściowych	Liczba par odczytów zmapowanych unikalnie	Procent odczytów zmapowanych unikalnie
SHAPE-K	309 491 080	240 249 685	77,63%
SHAPE-W	282 217 036	199 208 666	70,59%
SHAPE-C	272 766 108	207 286 586	75,99%

Tabela 13. Podsumowanie wyników mapowania odczytów z eksperymentu RNA-seq.

Próbka	Liczba par odczytów wejściowych	Liczba par odczytów zmapowanych unikalnie	Procent odczytów zmapowanych unikalnie
RNA-K	329 352 335	272 359 395	82,70%
RNA-W	271 993 250	235 227 491	86,48%
RNA-C	161 546 232	137 697 589	85,24%

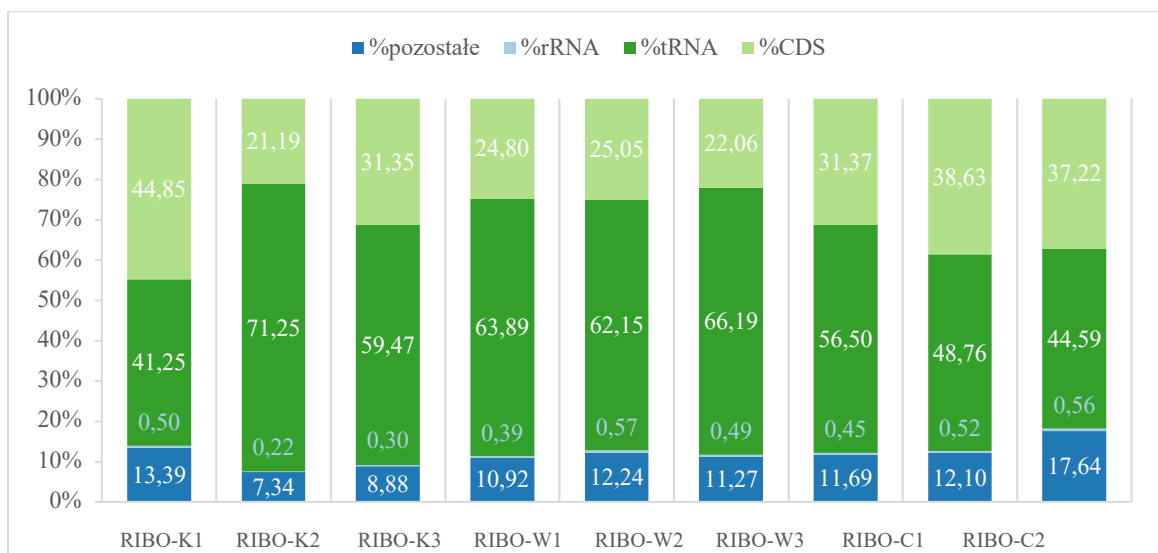
Tabela 14. Podsumowanie wyników mapowania odczytów z eksperymentu Ribo-seq.

Próbka	Liczba odczytów wejściowych	Liczba odczytów zmapowanych unikalnie	Procent odczytów zmapowanych unikalnie
RIBO-K1	50 736 131	10 776 566	21,24%
RIBO-K2	35 716 486	6 012 993	16,84%
RIBO-K3	47 057 577	8 266 522	17,57%
RIBO-W1	77 927 706	9 502 781	12,19%
RIBO-W2	33 768 841	3 918 028	11,60%
RIBO-W3	66 409 344	8 542 953	12,86%
RIBO-C1	34 735 857	4 959 987	14,28%
RIBO-C2	72 492 394	10 963 163	15,12%
RIBO-C3	51 317 823	9 202 726	17,93%

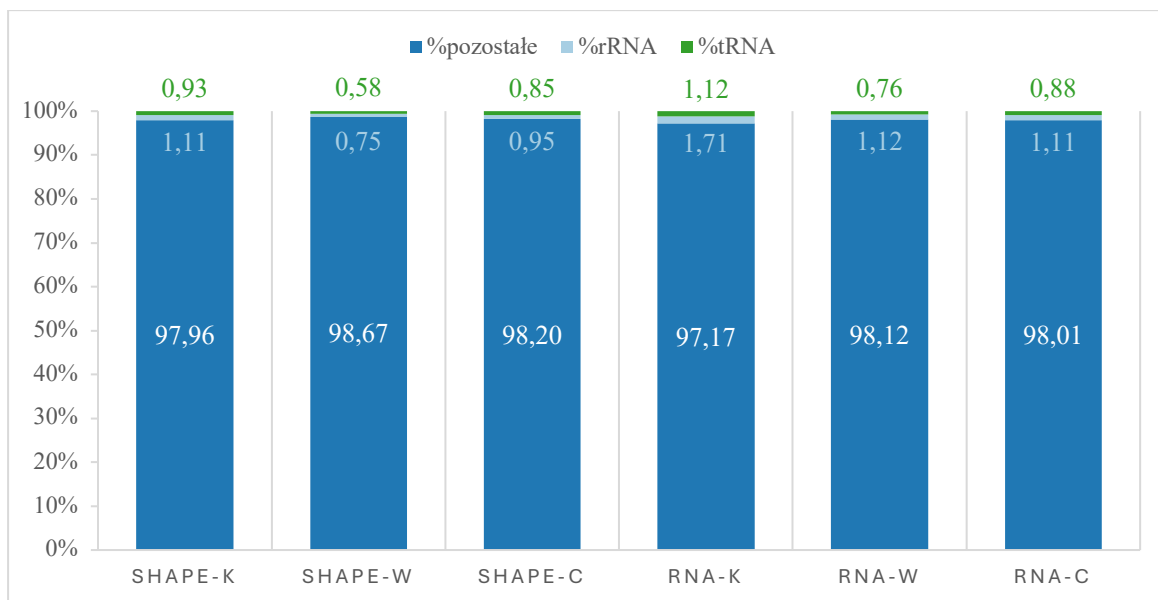
Wartość procentowa w ostatniej kolumnie tabel 12, 13 i 14 wskazuje, jaki odsetek całkowitych odczytów sekwencjonowania udało się przypisać jednoznacznie do konkretnego miejsca w genomie *S. aureus* Mu50. Dla danych transkryptomowych i strukturalnych wartości te wahają się od 70,59% (SHAPE-W) do 86,48% (RNA-W), co oznacza bardzo wysoką jakość danych. Próbkę z RNA-seq osiągają wyższe wskaźniki unikalnego mapowania (82-86%), natomiast w próbkach SHAPE-MaP widoczny jest spadek w odsetku odczytów mapujących unikalnie (71-77%), co może wynikać z mutacji wprowadzonych do sekwencji w wyniku odczytu adduktów wprowadzonych do jednoniciowych rejonów RNA podczas traktowania chemicznego próbek. Tak wysoki udział odczytów unikalnie zmapowanych wskazuje na dużą wiarygodność danych i potwierdza zasadność ich wykorzystania do dalszej analizy struktury drugorzędowej RNA. Wartości procentowe odczytów zmapowanych unikalnie w próbkach Ribo-seq są znacznie niższe i wahają się od 11,60% (RIBO-W2) do 21,24% (RIBO-K1), co oznacza, że tylko około 11-21% odczytów dla każdej próbki można jednoznacznie przypisać do konkretnej lokalizacji w genomie. Jest to spodziewany obraz, ze względu na niewielką długość sekwencjonowanych fragmentów RNA chronionych przed nukleazami przez rybosomy (15-40 nt). Krótkie sekwencje wykazują niższą unikalność w genomie, w związku z czym posiadają tendencję do mapowania w wiele miejsc.

Na podstawie analizy udziału biotypów genów zmapowanych w danych Ribo-seq oraz SHAPE-MaP i RNA-seq (Ryciny 7 i 8) dokonano oceny jakości przygotowanych bibliotek sekwencyjnych oraz efektywności procedury rybodeplecji. W danych Ribo-seq obserwuje się relatywnie niski udział sekwencji pochodzących z genów rRNA, co wskazuje na skuteczne usunięcie rybosomalnego RNA w trakcie przygotowania bibliotek. Jednocześnie dominacja odczytów zmapowanych do genów tRNA stanowi oczekiwany efekt wynikający z ochrony cząsteczek tRNA przez rybosomy podczas trawienia nukleazami, co prowadzi do ich współizolacji z aktywnie tłumaczonym mRNA.

W przypadku danych SHAPE-MaP i RNA-seq proporcjonalny udział genów rRNA i tRNA w odczytach sekwencyjnych był marginalny, co potwierdza wysoką jakość materiału oraz skuteczność zastosowanej procedury rybodeplecji. Wszystkie trzy typy danych wskazują na wysoką czystość molekularną oraz prawidłowe przygotowanie próbek do analizy sekwencyjnej.



Rycina 7. Wykres przedstawiający procentowy udział biotypów genów, do których zmapowane zostały odczyty z sekwencjonowania danych Ribo-seq. Niska zawartość genów rRNA świadczy o dobrze przeprowadzonym etapie rybodeplecji, co jest pożądanym zjawiskiem. Przewaga genów mapujących do genów tRNA jest naturalną konsekwencją izolowania fragmentów RNA, które pokryte były rybosomami na różnych etapach translacji. W przypadku fazy elongacji, cząsteczki tRNA mogły także zostać ochronione przed działaniem nukleaz i wraz z mRNA zostały zsekwencjonowane.



Rycina 8. Wykres przedstawiający procentowy udział biotypów genów, do których zmapowane zostały odczyty z sekwencjonowania danych SHAPE-MaP/RNA-seq. Niski odsetek genów mapujących do rRNA i tRNA świadczy to o dobrze przygotowanych bibliotekach do sekwencjonowania i o dobrze przeprowadzonym etapie rybodeplecji.

Do usunięcia odczytów mapujących do sekwencji rRNA i tRNA wykorzystano skrypt przeznaczony do filtrowania odczytów sekwencjonowania w formacie BAM na podstawie ich pokrycia z określonymi cechami adnotacji genomowej, opisany w rozdziale 3.10.2. Jego zastosowanie jest szczególnie istotne w badaniach nad mechanizmami regulacji translacyjnej, ponieważ umożliwia precyzyjne usunięcie odczytów, które mogą być artefaktami – na przykład sekwencje pochodzące z rRNA lub tRNA, które nie odzwierciedlają aktywności kodujących transkryptów. Dane z eksperymentu SHAPE-MaP zawierały średnio 1,13% odczytów mapujących do rRNA oraz 0,85% odczytów mapujących do tRNA, natomiast dane z eksperymentu Ribo-seq zawierały średnio 0,44% odczytów mapujących do rRNA oraz 57% odczytów mapujących do tRNA. Podsumowanie wyników filtrowania odczytów w poszczególnych próbkach opisano w tabelach (Tabela 15, 16 i 17).

Tabela 15. Podsumowanie filtrowania odczytów mapujących do rRNA oraz tRNA w danych z eksperymentu SHAPE-MaP.

Próbka	Liczba odczytów wejściowych	Liczba zachowanych odczytów	Procent zachowanych odczytów	Procent rRNA	Procent tRNA
SHAPE-K	240 249 685	235 360 545	97,96	1,11	0,93
SHAPE-W	199 208 666	196 543 426	98,66	0,75	0,58
SHAPE-C	207 286 586	203 558 740	98,20	0,95	0,85

Tabela 16. Podsumowanie filtrowania odczytów mapujących do rRNA oraz tRNA w danych z eksperymentu RNA-seq.

Próbka	Liczba odczytów wejściowych	Liczba zachowanych odczytów	Procent zachowanych odczytów	Procent rRNA	Procent tRNA
RNA-K	272 359 395	264 663 135	97,17	1,71	1,12
RNA-W	235 227 491	230 805 305	98,12	1,12	0,76
RNA-C	137 697 589	134 949 757	98,00	1,11	0,88

Tabela 17. Podsumowanie filtrowania odczytów mapujących do rRNA oraz tRNA w danych z eksperymentu Ribo-seq.

Próbka	Liczba odczytów wejściowych	Liczba zachowanych odczytów	Procent zachowanych odczytów	Procent rRNA	Procent tRNA
RIBO-K1	10 776 566	6 276 734	58,244	0,502	41,253
RIBO-K2	6 012 993	1 715 430	28,529	0,224	71,247
RIBO-K3	8 266 522	3 325 785	40,232	0,297	59,471
RIBO-W1	9 502 781	3 394 761	35,724	0,388	63,888
RIBO-W2	3 918 028	1 460 763	37,283	0,570	62,147
RIBO-W3	8 542 953	2 846 709	33,322	0,491	66,187
RIBO-C1	4 959 987	2 135 579	43,056	0,446	56,498
RIBO-C2	10 963 163	5 561 407	50,728	0,515	48,757
RIBO-C3	9 202 726	5 048 586	54,860	0,556	44,585

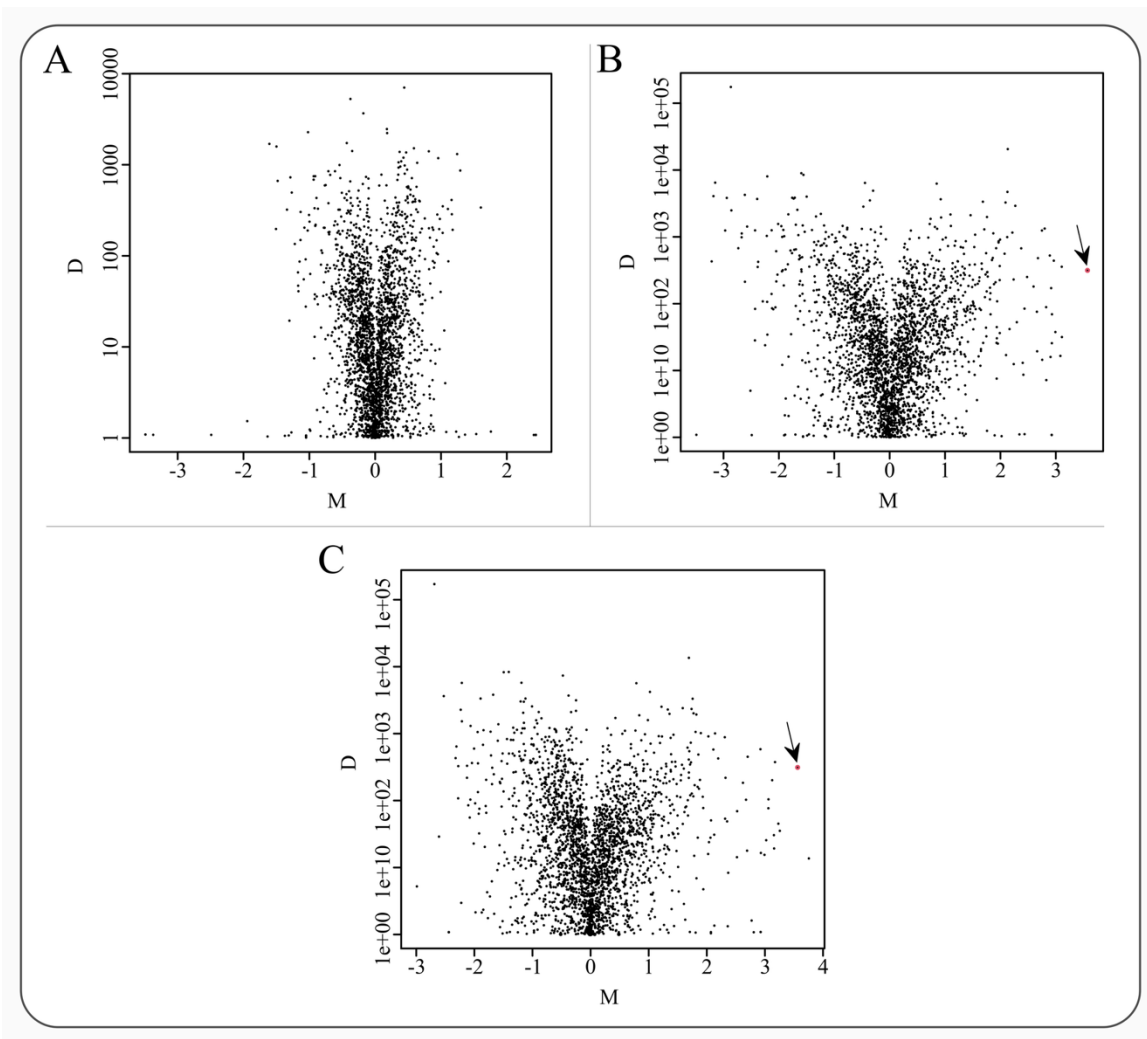
4.1.2. Różnicowa ekspresja genów w odpowiedzi na traktowanie antybiotykami

Analiza różnicowej ekspresji genów kodujących białka pomiędzy próbą kontrolną a próbkami traktowanymi cefoksytyną lub wankomycyną umożliwia ocenę odpowiedzi komórki na działanie tych antybiotyków. Pozwala ona zidentyfikować geny, których aktywność ulega istotnym zmianom w warunkach stresu antybiotykowego, co może odzwierciedlać mechanizmy adaptacyjne, obronne lub związane z opornością. Tego rodzaju analiza stanowi istotny etap w zrozumieniu wpływu czynników środowiskowych na regulację ekspresji genów i tworzy podstawę do dalszych badań. W porównaniu próbek traktowanych wankomycyną z próbką kontrolną zidentyfikowano pojedynczy gen, którego ekspresja różniła się istotnie statystycznie ($q < 0,05$) (Rycina 9B, 9C). Gen ten, oznaczony jako SAV_RS13050, koduje białko podjednostki alfa reduktazy azotanowej, wchodzące w skład kompleksu reduktazy azotanowej oraz uczestniczy w oddychaniu beztlenowym. Gen ten wykazywał również istotną statystycznie różnicę w ekspresji w porównaniu wanokomycyna - cefoksytyna, co świadczy o jego specyficznej indukcji przez wankomycynę. W zestawieniu próbek kontrolnych z próbkami traktowanymi cefoksytyną nie wykryto istotnych różnic w ekspresji żadnego z genów (Rycina 9A). Wyniki te

wskazują na ograniczony wpływ zastosowanych warunków stresowych na profil transkryptomiczny bakterii.

W analizie różnic ekspresji genów przedstawionej za pomocą wykresów typu Mean–Difference (MD) (Rycina 9) porównano trzy zestawy warunków hodowlanych: kontrola vs. cefoksytyna (A), kontrola vs. wankomycyna (B) oraz cefoksytyna vs. wankomycyna (C). Porównanie próby kontrolnej z próbką traktowaną cefoksytyną (A) wykazało wysokie podobieństwo profili ekspresji, czego dowodem była ograniczona rozpiętość wartości krotności zmiany oraz niska wartość różnic bezwzględnych w ekspresji genów. W porównaniach kontrola vs. wankomycyna (B) oraz cefoksytyna vs. wankomycyna (C) zaobserwowano szersze spektrum zmian ekspresji, wskazujące na globalne różnice w regulacji transkryptomicznej indukowanej wankomycyną. Sugeruje to, że antybiotyk ten wywołuje silniejszą odpowiedź komórkową na poziomie ekspresji genów w porównaniu z cefoksytyną. Jest to zgodne z charakterystyką szczepu MRSA, który posiada odporność na antybiotyki beta-laktamowe, takie jak cefoksytyna i metycylina, jednak jest wrażliwy na wankomycynę.

Z uwagi na ograniczoną liczbę wykrytych genów różnicujących, wyniki te należy interpretować z ostrożnością. Metoda zastosowana w analizie, oparta na pakiecie *NOISeq*, wykorzystuje generowanie symulowanych powtórzeń technicznych w celu oszacowania zmienności ekspresji pomiędzy warunkami. Choć pozwala to na identyfikację globalnych trendów, losowy charakter procesu symulacji może wpływać na ograniczoną powtarzalność wyników oraz zmienność wartości ilościowych ekspresji. Tym samym, pojedyncze istotne sygnały mogą nie odzwierciedlać biologicznie znaczących różnic, lecz raczej wynikać z fluktuacji generowanych w ramach modelu probabilistycznego (Tarazona i in. 2013). Te same ograniczenia dotyczą także analizy zmienności poziomu translacji oraz jej efektywności opisanych w późniejszych podrozdziałach.

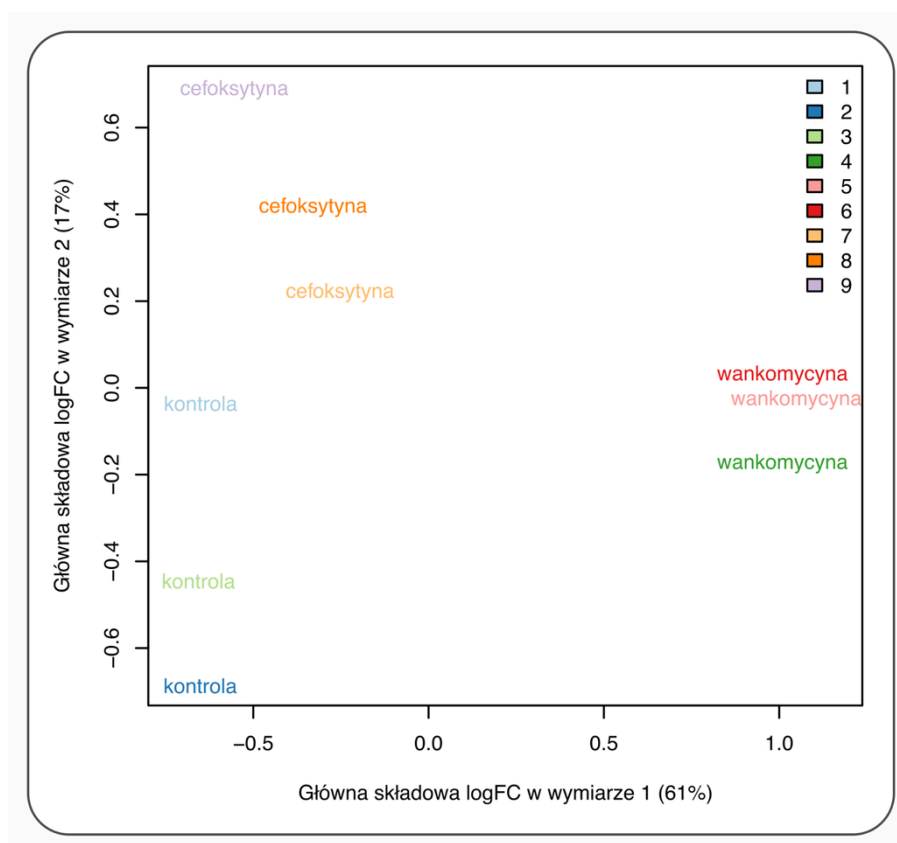


Rycina 9. Wykres przedstawiający zmianę logarytmiczną (M) i wartość bezwzględną (D) różnicy w ekspresji między warunkami (D). Wartości D są wyświetlane w skali logarytmicznej. A. Kontrola vs. Cefoksytyna; B. Kontrola vs. Wankomycyna; C. Cefoksytyna vs. Wankomycyna; M – $\log_2(\text{warunek1}/\text{warunek2})$ czyli logarytm z krotności zmiany (FC); D – wartość bezwzględna różnicy w ekspresji genów [$\text{warunek1}-\text{warunek2}$] wyrażona w cpm (Tarazona i in. 2013). Strzałką oraz czerwonym kółkiem zaznaczono geny o statystycznie istotnej różnicy w ekspresji. Na wykresach zaobserwować można podobieństwo ekspresji genów pomiędzy próbą kontrolną oraz traktowaną cefoksytyną (A), przejawia się to mniejszą zmianą w ekspresji genów (D) oraz mniejszą rozpiętością wartości FC . Natomiast na panelach B i C widoczne jest podobieństwo w zmianach profili ekspresji genów w odpowiedzi na traktowanie wankomycyną w stosunku do próby kontrolnej jak i do próby traktowanej cefoksytyną. W obu przypadkach widoczna jest większa różnica w ekspresji poszczególnych genów.

4.1.3. Badanie poziomu translacji

Wykonana analiza skalowania wielowymiarowego (MDS, ang. *Multidimensional Scaling Plot*; Chen i in., 2020) ukazała wyraźne zgrupowanie próbek zgodne z warunkami

hodowlanymi, wskazując na wysoką zgodność profili translacji w obrębie poszczególnych warunków eksperymentalnych (Rycina 10). Ze względu na wysokie podobieństwo powtórzeń biologicznych zdecydowałam się na ich łączenie w dalszych analizach, zwiększając tym samym głębokość pokrycia genów odczytami oraz poprawiając czułość i wiarygodność uzyskiwanych wyników.



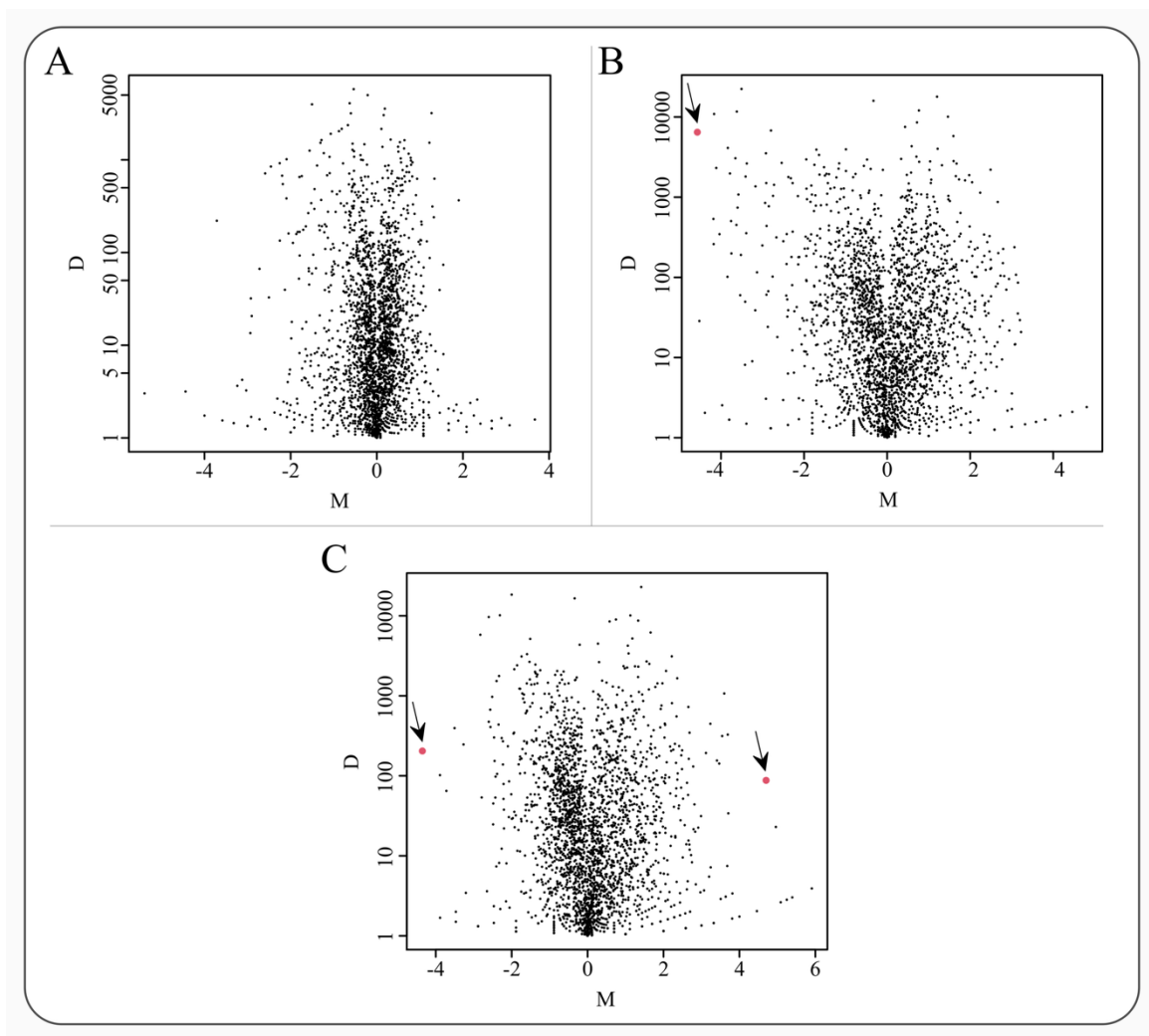
Rycina 10. Grupowanie poszczególnych próbek w zestawie danych z eksperymentu Ribo-seq. Wykres MDS przedstawia dwa główne wymiary, które łącznie wyjaśniają istotną część całkowitej zmienności w obrębie analizowanych próbek (Chen i in. 2020). Pierwszy wymiar, reprezentowany na osi X, odpowiada za 61% całkowitej zmienności i stanowi główny kierunek różnicowania próbek, umożliwiając ich grupowanie zgodnie z profilem translacji. Drugi wymiar, widoczny na osi Y, wyjaśnia 17% zmienności i odgrywa rolę pomocniczą, dostarczając dodatkowego kontekstu w klasyfikacji próbek. Wysoki dystans próbek traktowanych wankomycyną od próbek kontrolnych oraz traktowanych cefoksytyną w wymiarze pierwszym świadczy o większej różnicy pomiędzy ich profilami translacji. Natomiast próbki traktowane cefoksytyną oraz kontrolne są bardziej do siebie zbliżone w pierwszym wymiarze i różnicują się dopiero w wymiarze drugim, pomocniczym.

Wizualizacja wyników ukazuje dwa główne komponenty przestrzeni MDS, które łącznie wyjaśniają znaczną część całkowitej zmienności poziomów translacji w badanych warunkach (Chen i in., 2020). Pierwszy wymiar, odpowiadający osi X, tłumaczy 61%

obserwowanej zmienności i stanowi główny kierunek różnicowania próbek, umożliwiając ich efektywne grupowanie w zależności od profilu translacyjnego. Drugi wymiar (oś Y), wyjaśniający 17% zmienności, pełni rolę uzupełniającą, pozwalając na uchwycenie subtelniejszych różnic między warunkami eksperymentalnymi. Zauważalne rozdzielanie próbek traktowanych wankomycyną względem próbek kontrolnych oraz traktowanych cefoksytyną w pierwszym wymiarze świadczy o wyraźnej modulacji translacji indukowanej przez wankomycynę. Jednocześnie bliskość próbek kontrolnych i eksponowanych na cefoksytynę w pierwszym wymiarze wskazuje na podobieństwo ich profili ekspresji, z różnicami ujawniającymi się dopiero w wymiarze drugim. Układ próbek na wykresie MDS potwierdza, że wankomycyna wywołuje większe zmiany w profilu translacyjnym komórek w porównaniu do cefoksytyny, której wpływ jest mniej wyraźny w analizowanych wymiarach.

W przeprowadzonej analizie różnicowej pomiędzy warunkami hodowlanymi nie zidentyfikowano wielu genów wykazujących istotne i specyficzne zmiany poziomu translacji, które pozwalałyby na klarowne rozróżnienie badanych zestawów próbek. W porównaniu próbek kontrolnych z próbkami traktowanymi cefoksytyną nie wykryto żadnych genów spełniających kryteria istotności statystycznej. Natomiast w porównaniu próbek kontrolnych z próbkami poddanymi działaniu wankomycyny zidentyfikowano pojedynczy gen, SAV_RS07675, kodujący enzym reduktazę peptydo-metioniny (S)-S-tlenku MsrA, który odgrywa rolę w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz w procesach naprawy uszkodzonych białek poprzez reakcje redoks z udziałem tioredoksyny. W zestawieniu próbek traktowanych cefoksytyną i wankomycyną wykryto dwa geny różnicujące translację na poziomie istotnym statystycznie: SAV_RS05220, kodujący syntazę argininobursztynianową zaangażowaną w wiązanie ATP i biosyntezę argininy, oraz SAV_RS14270, którego produkt białkowy nie posiada obecnie jednoznacznie określonej funkcji i został sklasyfikowany jako białko hipotetyczne. Brak powtarzających się statystycznie istotnych genów pomiędzy porównaniami wankomycyna – kontrola oraz wankomycyna-cefoksytyna świadczy o specyficzności odpowiedzi komórkowej na każdy z antybiotyków.

Na podstawie wykresów typu MD (Mean-Difference) porównujących zmiany poziomów translacji w odpowiedzi na traktowanie antybiotykami zaobserwowano istotne różnice w dynamice aktywności translacyjnej genów (Rycina 11).



Rycina 11. Wykres przedstawiający zmianę logarytmiczną (M) i wartość bezwzględną (D) różnicy w translacji między warunkami (D). Wartości D są wyświetlane w skali logarytmicznej. A. Kontrola vs. Cefoksytyna; B. Kontrola vs. Wankomycyna; C. Cefoksytyna vs. Wankomycyna; M – logarytm z krotności zmiany (FC , ang. fold change); D – wartość bezwzględna różnicy w aktywności translacyjnej [warunek1-warunek2] wyrażona w cpm (Tarazona i in. 2013). Strzałką oraz czerwonym kółkiem zaznaczono geny różniące się istotnie statystycznie. Wykresy wskazują na zbliżony poziom translacji między próbką kontrolną a próbką poddaną działaniu cefoksytyny, co przejawia się niewielkimi zmianami w poziomach translacji (D) oraz mniejszą rozpiętością wartości FC . Z kolei podwykresy B i C ukazują podobieństwo profili poziomów translacji w próbce traktowanej wankomycyną, zarówno względem próbki kontrolnej, jak i tej eksponowanej na cefoksytynę. W obu analizowanych porównaniach dostrzegalne są wyraźniejsze różnice w poziomie translacji poszczególnych genów.

Podobnie jak w przypadku wyników eksperymentu RNA-seq, analiza porównania próbki kontrolnej z próbką traktowaną cefoksytyną (A) wykazała niewielkie zmiany zarówno w wartościach bezwzględnych (D), jak i w zakresie logarytmicznej zmiany ekspresji (M), co

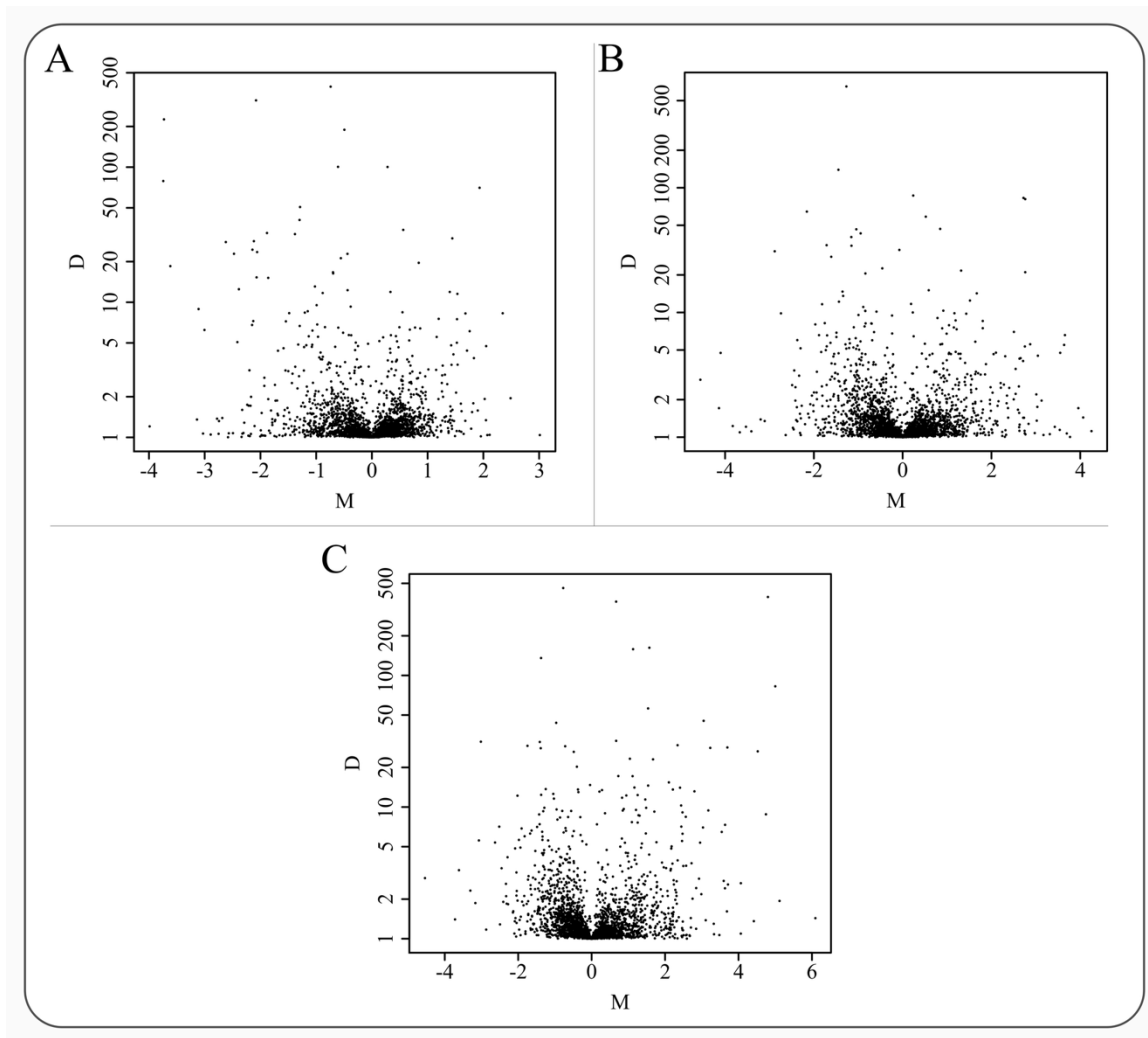
wskazuje na wysoki stopień podobieństwa profilu translacyjnego dla tych warunków. Natomiast traktowanie wankomycyną (B, C) indukowało szersze spektrum zmian translacyjnych, przejawiające się większą rozpiętością wartości FC oraz większymi różnicami w poziomach translacji (oś D). Wyniki te wskazują, że ekspozycja na wankomycynę prowadzi do bardziej wyraźnych zmian w profilu translacji niż w przypadku użycia cefoksytyny. Obserwacje te, podobnie jak w przypadku eksperymentu RNA-seq, są zgodne z charakterystyką szczepu MRSA, który wykazuje oporność na antybiotyki beta-laktamowe (cefoksytyna) oraz wrażliwość na wankomycynę. Należy jednak zwrócić uwagę, że skala bezwzględnych różnic translacyjnych (oś D) w danych Ribo-seq (Rycina 11) jest ponad dziesięciokrotnie niższa niż w analogicznej analizie RNA-seq (Rycina 9). Maksymalne wartości D w przypadku Ribo-seq osiągają około 10 000 cpm, podczas gdy w RNA-seq dochodzą do 100 000 cpm. Wskazuje to, że mimo obecności różnic w translacji, ich intensywność jest niższa niż na poziomie transkrypcji, co może odzwierciedlać dodatkową warstwę regulacyjną na poziomie translacji oraz selektywną aktywność rybosomów w odpowiedzi na działanie antybiotyków. Niemniej jednak takie różnice w skali wartości D podkreślają odmienne mechanizmy działania obu antybiotyków oraz ich wpływ na regulację ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*.

4.1.4. Efektywność translacji

Następnym krokiem było przeanalizowanie efektywności translacji (TE, *ang. translation efficiency*), określonej jako stosunek poziomu translacji do poziomu ekspresji mRNA danego genu. W tym celu, dla każdego genu, poziom translacji z eksperymentu Ribo-seq odniesiony został do zmierzonego poziomu mRNA w eksperymencie RNA-seq. Przeprowadzona analiza nie ujawniła istotnych statystycznie różnic w efektywności translacyjnej genów obserwowanych we wszystkich analizowanych warunkach eksperymentalnych (Rycina 12).

Ponadto, obserwowana zmienność efektywności translacji jest niższa niż w przypadku poziomów transkryptów oraz translacji oznaczonych na podstawie danych RNA-seq i Ribo-seq. W odróżnieniu od danych transkryptomicznych i translacyjnych, nie zaobserwowano wyraźnych różnic pomiędzy odpowiedzią na traktowanie cefoksytyną oraz wankomycyną. Obserwacje te sugerują, że obserwowane pomiędzy antybiotykami różnice

w zmianie poziomów translacji (Rycina 11) są głównie powiązane z różnicami w zmianach poziomu mRNA (Rycina 9).

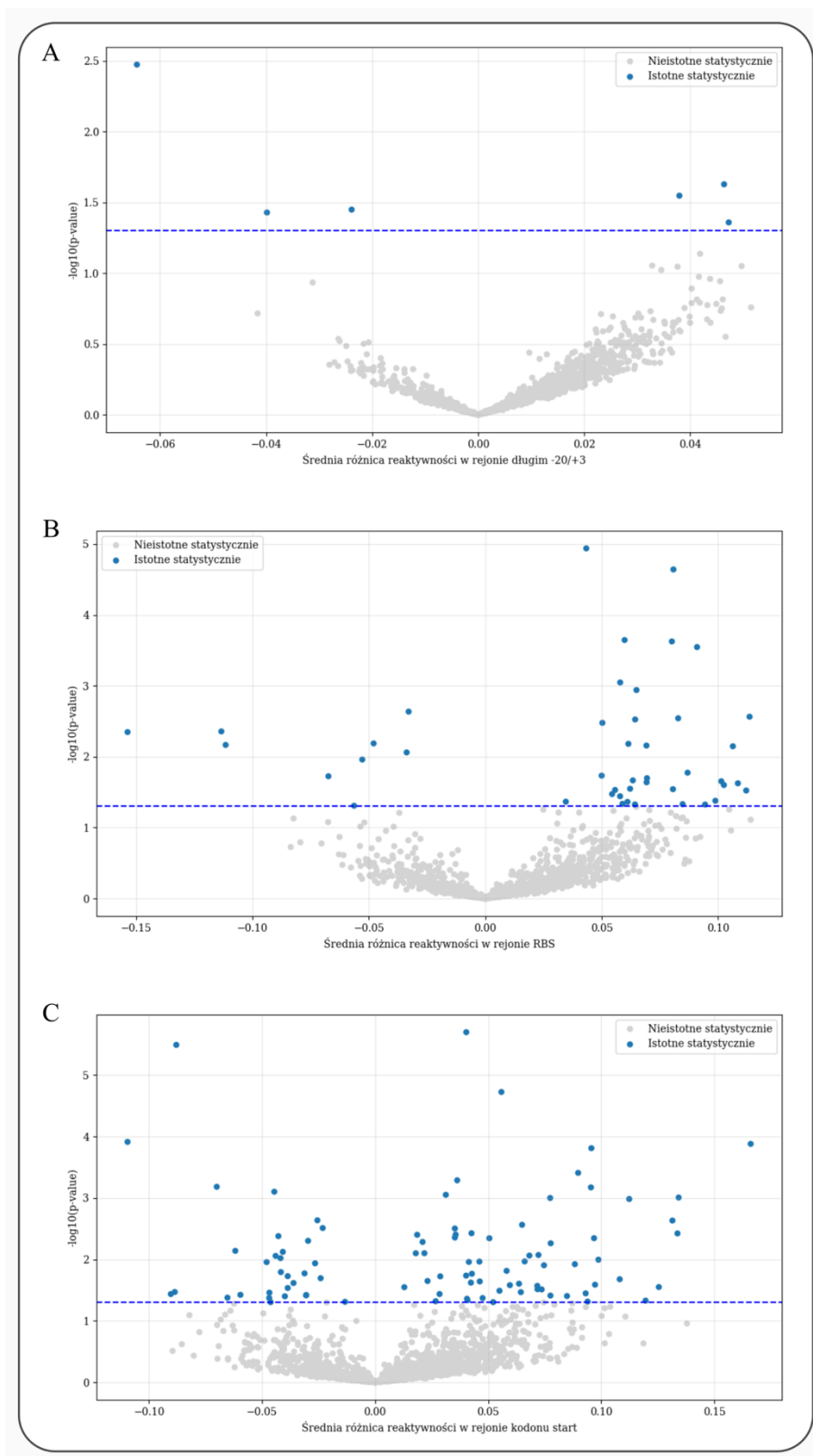


Rycina 12. Wykres przedstawiający zmianę logarymiczną (M) i wartość bezwzględną (D) różnicy w efektywności translacji między warunkami (D). Wartości D są wyświetlane w skali logarymicznej. A. Kontrola vs. Cefoksytyna; B. Kontrola vs. Wankomycyna; C. Cefoksytyna vs. Wankomycyna; M – $\log_2(\text{warunek1}/\text{warunek2})$ czyli logarytmiczna zmienna krotności efektywności translacji (FC); D – wartość bezwzględna różnicy w efektywności translacji [$\text{warunek1}-\text{warunek2}$] (Tarazona i in. 2013). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w efektywności translacji pomiędzy warunkami hodowlanymi.

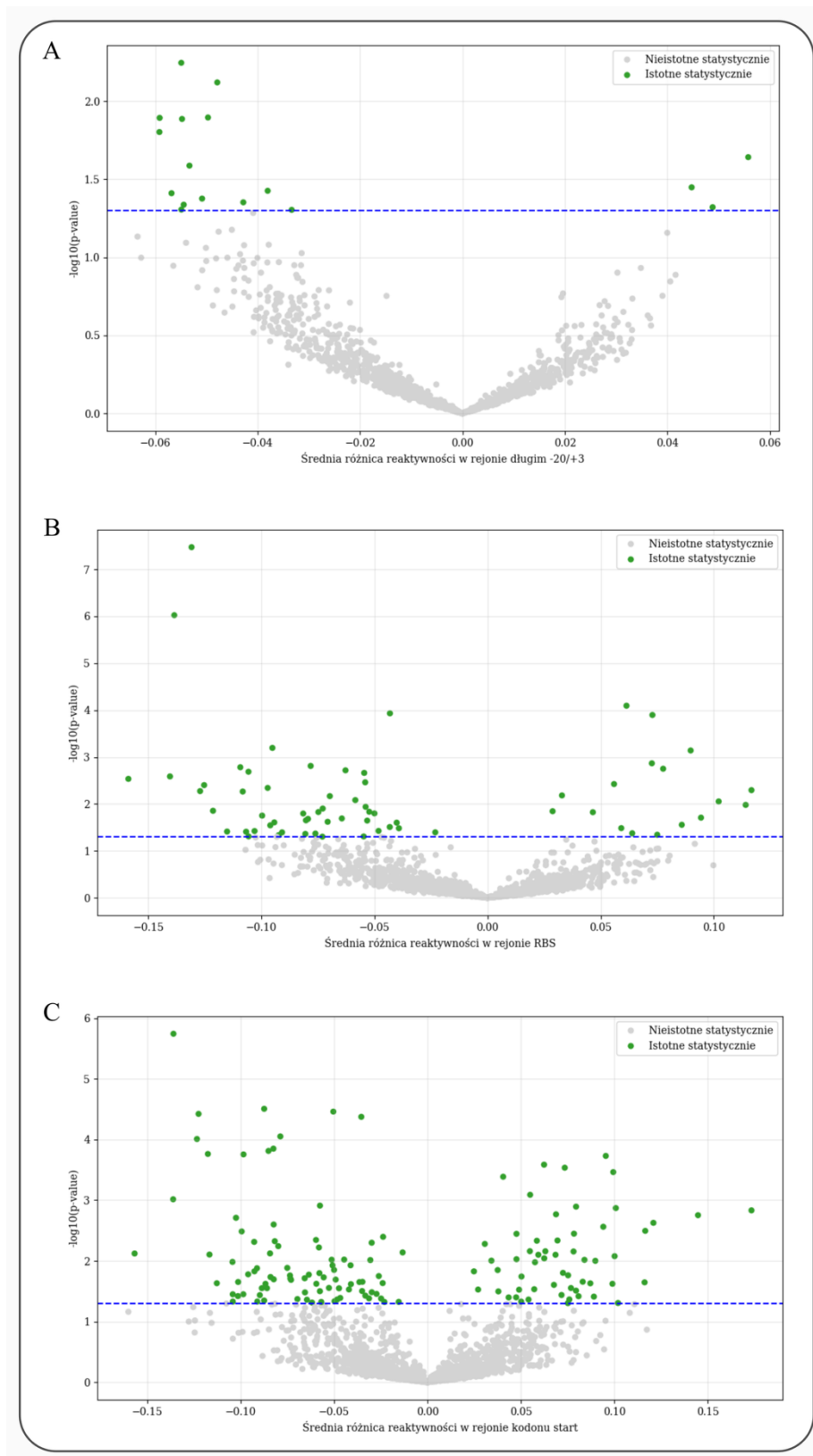
4.1.5. Dostępność strukturalna RNA

W następnym kroku przeanalizowano indukowane obecnością antybiotyku zmiany w dostępności strukturalnej rejonów mRNA istotnych w inicjacji translacji: RBS, kodonu start oraz szerokiego rejonu obejmującego pozycje -20/+3 względem kodonu start (Rycina 6). W tym celu dla każdego z rejonów wykonano analizę statystyczną zmian reaktywności nukleotydów względem odczynnika użytego w eksperymencie SHAPE - 1M7 (szczegóły w sekcji Materiały i metody) (Ryciny 13-15). W analizie statystycznej porównującej reaktywność strukturalną mRNA pomiędzy warunkami eksperymentalnymi zaobserwowano zależność pomiędzy wielkością analizowanego obszaru transkryptu a liczbą genów wykazujących istotne różnice w poziomie reaktywności strukturalnej. Zjawisko to uwidacznia się szczególnie w przypadku szerokiego regionu, obejmującego pozycje nukleotydowe w przedziale od -20 do +3 względem kodonu startowego, który charakteryzuje się mniejszym rozproszeniem sygnału i niższą średnią zmiennością strukturalną. W konsekwencji, zastosowanie średniej arytmetycznej jako miary reaktywności dla tak rozległych obszarów może prowadzić do częściowej utraty lokalnych sygnałów różnicujących — fluktuacje wartości reaktywności mogą się znosić lub rozmywać w wartościach agregowanych, co obniża czułość wykrywania zmian pomiędzy warunkami. Natomiast w obszarach krótszych takich jak RBS (5 nukleotydów) oraz kodon start (3 nukleotydy) średnia arytmetyczna jest zbliżona do realnej wartości reaktywności poszczególnych nukleotydów w zbiorze i wykazuje wyraźniejszą sygnaturę różnic strukturalnych.

W kolejnym etapie analizy zidentyfikowano geny, które wykazują statystycznie istotne różnice w reaktywności RNA w dwóch kluczowych regionach translacyjnych — kodonie start oraz regionie RBS — pomiędzy próbkami kontrolnymi a próbkami traktowanymi antybiotykami: cefoksytiną oraz wankomycyną. Zmiany konformacyjne w obu tych obszarach, mogą wskazywać na funkcjonalne przeorganizowanie struktury RNA w odpowiedzi na działanie antybiotyku.

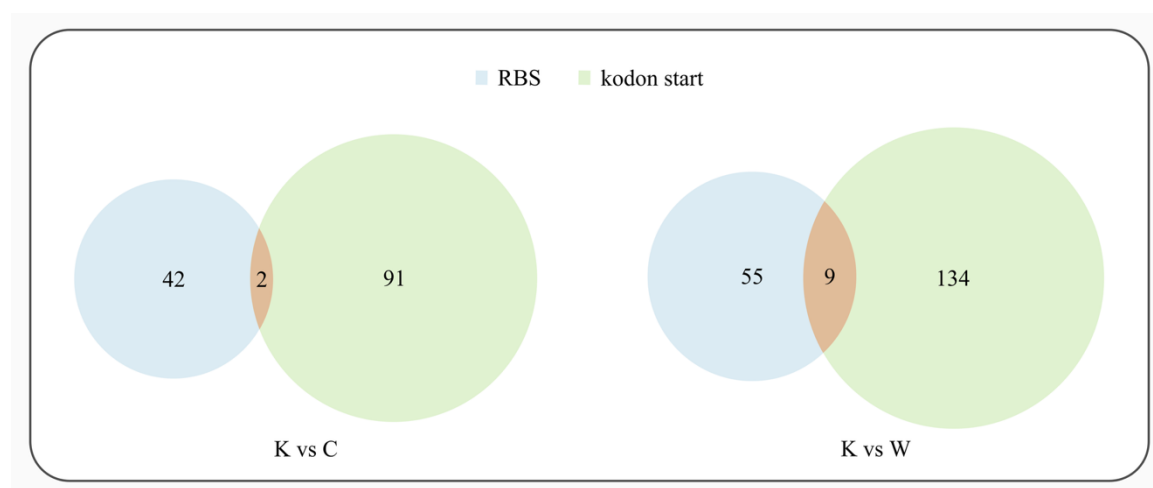


Rycina 13. Wykresy rozrzutu logarytmu wartości – względem średnich różnic w reaktywności strukturalnej RNA w obszarze -20/+3 nukleotydów wokół kodonu startowego (A), miejscu wiązania rybosomu (B), pozycjach kodonu start (C) dla danych z próby traktowanej cefoksytyną w odniesieniu do próby kontrolnej. Geny o istotnej statystycznie różnicy oznaczone są kolorem niebieskim



Rycina 14. Wykresy rozrzutu logarytmu wartości – względem średnich różnic w reaktywności strukturalnej RNA w obszarze -20/+3 nukleotydów wokół kodonu startowego (A), miejscu wiązania rybosomu (B), pozycjach kodonu start (C) dla danych z próby traktowanej wankomycyną w odniesieniu do próby kontrolnej. Geny o istotnej statystycznie różnicy oznaczone są kolorem zielonym.

Porównano listy genów wykazujących statystycznie istotne różnice w średnich reaktywnościach we wspomnianych obszarach wykorzystując diagramach Venna (Rycina 15). Zaobserwowane różnice w reaktywności wspólne dla rejonów RBS oraz kodonu start wskazują na istotne zmiany konformacyjne w obrębie analizowanych rejonów, co może wpływać na ich dostępność dla czynników translacyjnych lub regulatorowych. Na podstawie adnotacji genomowej zidentyfikowano produkty tych genów.



Rycina 15. Diagramy Venna przedstawiające części wspólne zbiorów reprezentujących geny o istotnych statystycznie różnicach w średnich wartościach reaktywności w trzech obszarach transkryptu: kodon start (kolor zielony), RBS – miejsce wiązania rybosomu (kolor niebieski). Diagram z lewej strony przedstawia wyniki porównania dla zestawu warunków hodowlanych - kontrola vs. cefoksytyna; a z prawej strony - kontrola vs. wankomycyna;

W zestawieniu danych kontrolnych z próbkami traktowanymi cefoksytyną zidentyfikowano dwa geny które wykazują istotną statystycznie różnicę w reaktywności w obu analizowanych regionach.: SAV_RS03665, którego produktem jest białko z rodziny Bax inhibitor-1 oraz SAV_RS09475, którego produkt (MarR family transcriptional regulator) wykazuje aktywność czynnika wiążącego DNA w procesie transkrypcji. Białka z rodziny MarR regulują ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym, opornością na antybiotyki, metabolizmem i wirulencją, reagując na obecność małych cząsteczek lub modyfikacje cystein (Grove 2013). Ponadto wartość różnicy średniej reaktywności w regionie kodonu start oraz RBS dla genu SAV_RS09475 w obu obszarach jest ujemna, co oznacza, że w próbce traktowanej wankomycyną dostępność strukturalna miejsca inicjacji translacji jest większa. Gen SAV_RS03665 nie wykazuje wspólnego trendu zmianach dostępności strukturalnej dla miejsca inicjacji translacji. W regionie start

reaktywność jest większa w próbie traktowanej, natomiast w miejscu wiązania rybosomu większe prawdopodobieństwo jednoniciowości jest dla próby kontrolnej.

W przypadku porównania danych kontrolnych z próbkami traktowanymi wankomycyną zidentyfikowano dziewięć genów, których opis umieszczono w Tabeli 18.

Tabela 18. Geny MRSA (S. aureus) o statystycznie istotnych zmianach reaktywności strukturalnej w regionie kodonu start oraz sekwencji RBS w porównaniu kontroli i prób traktowanych wankomycyną.

ID genu	Produkt białkowy	Funkcja biologiczna
SAV_RS01700	Białko z rodziny transporterów formiatu/azotynu (FNT)	Transport małych anionów (formiatu, azotynu, HS ⁻) przez błonę komórkową; kanały eksportujące produkty fermentacji lub importujące substraty do szlaków redukcyjnych;
SAV_RS09195	Białko transportujące toluenosulfonian (TSUP)	Wtórny transport związków siarkowych;
SAV_RS11290	Białko rodziny Tex	Czynnik pomocniczy w transkrypcji; białko wiążące RNA;
SAV_RS13505	Białko zawierające domenę DUF1433	Białko błonowe o nieznannej funkcji;
SAV_RS09995	Rodzina białek SAS053	Toksyna hamująca aktywność gyrazy DNA, prowadząca do zahamowania syntezy DNA i RNA;
SAV_RS14515	Białko hipotetyczne	Nieznana;
SAV_RS09605	Białko zawierające domenę nukleazową (NERD)	Funkcja zbliżona do nukleolitycznej; czynnik regulacyjny związany z obróbką DNA;
SAV_RS08360	Białko wiążące penicylinę 2 (PBP2)	Białko wiążące penicylinę o zmniejszonym powinowactwie do antybiotyku; warunkuje oporność na antybiotyki beta-laktamowe;
SAV_RS07840	Zależna od ATP helikaza DNA DinG	Naprawa dwuniciowych pęknięć w DNA;

Wśród zidentyfikowanych genów znajdują się zarówno dobrze scharakteryzowane jednostki funkcjonalne, jak i hipotetyczne białka o nieznanym roli biologicznej.

W zestawieniu obecne są m.in. geny kodujące białka transporterowe z rodzin FNT i TSUP. Białka FNT uczestniczą w transporcie małych anionów (formiatu, azotynu, HS⁻) przez błonę komórkową, pełniąc funkcję kanałów eksportujących produkty fermentacji lub importerów substratów do szlaków redukcyjnych (Lü i in 2013). Białka TSUP, zgodnie z badaniami Shlykov i współpracowników z 2012 roku, mogą uczestniczyć w odpowiedzi komórkowej na stres, szczególnie związany ze związkami siarkowymi.

Zidentyfikowano również gen kodujący białko Tex, należące do konserwatywnej rodziny czynników pomocniczych transkrypcji. Białka Tex wiążą kwasy nukleinowe i regulują ekspresję genów związanych z adaptacją bakterii do zmiennych warunków środowiskowych (He i in. 2006). Podobną rolę regulacyjną może pełnić białko zawierające domenę NERD, której funkcja jest zbliżona do nukleaz i może być związana z obróbką DNA, w tym replikacją, rekombinacją i naprawą. Obecność tej domeny w sąsiedztwie genów wirulencji sugeruje jej potencjalny udział w remodelowaniu DNA lub adaptacji patogenów (Grynberg & Godzik 2004).

W zestawieniu znalazła się również zależna od ATP helikaza DinG, która wykazuje kierunkowość 5'→3' i uczestniczy w utrzymaniu stabilności genomu poprzez naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. DinG może dodatkowo regulować szlaki metaboliczne w odpowiedzi na stres genotoksyczny, co zostało wykazane w badaniach prowadzonych na *Neisseria meningitidis* (Frye i in. 2017).

Wśród genów o funkcji związanej z regulacją DNA znajduje się także *tsbT*, reprezentant rodziny białek SAS053. TsbT to toksyna z układu toksyna–antytoksyna w *Staphylococcus aureus*, która hamuje aktywność gyrazy DNA, prowadząc do zahamowania syntezy DNA i RNA oraz relaksacji struktury plazmidu (Kato i in. 2023).

4.1.6. Metoda identyfikacji zmian strukturalnych powiązanych ze zmianami w translacji mRNA

Aby zweryfikować, czy istnieje zależność pomiędzy zmianami w efektywności translacji a dostępnością strukturalną rejonów mRNA biorących udział w inicjacji tego procesu, stworzono program napisany w języku Python służący do analizy relacji między wydajnością translacji a reaktywnością strukturalną RNA w obrębie regionów 5' UTR oraz miejsc wiązania rybosomów (RBS) w różnych warunkach eksperymentalnych. Metoda ta

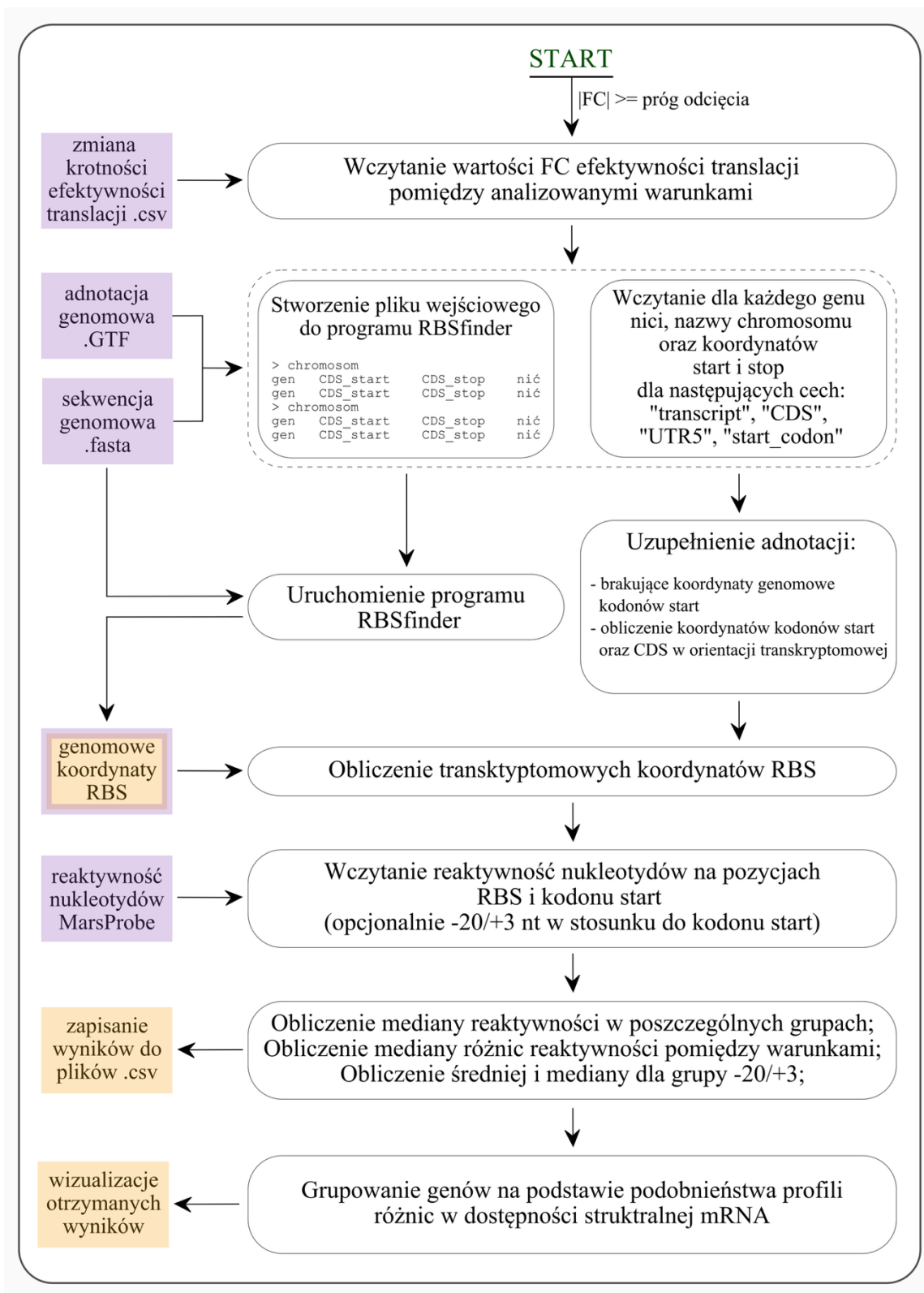
przyjmuje na wejściu kilka parametrów obligatoryjnych oraz kilka opcjonalnych (Tabela 18). Integruje ona wiele źródeł danych, w tym wartości zmian efektywności translacji, sekwencję genomową, adnotacje genomowe oraz profile reaktywności nukleotydów, aby ocenić wpływ cech strukturalnych na regulację ekspresji genów. Do poprawnego funkcjonowania metoda wykorzystuje następujące biblioteki Pythona: `argparse` (<https://docs.python.org/3/library/argparse.html>), `os` (<https://docs.python.org/3/library/os.html>), `pandas` (McKinney 2010), `sklearn` (Pedregosa i in. 2011), `matplotlib` (Hunter 2007), `seaborn` (Waskom 2021) oraz `statistics` (<https://docs.python.org/3/library/statistics.html>), a także program RBSfinder (Suzek i in. 2001) do wykrywania miejsc startowych translacji.

Tabela 19. Opis parametrów wejściowych stworzonej metody i ich wartości domyślne, jeśli występują.

Parametr	Opis
<code>input</code>	Ścieżka do pliku zawierającego kolumnę z krotnością zmiany efektywności translacji pomiędzy dwoma warunkami eksperymentalnymi, gdzie nazwami wierszy są identyfikatory genów
<code>-d / --delimiter</code>	Separator kolumn w pliku wejściowym. Domyślnie przecinek
<code>-fc / --fold_change</code>	Numer kolumny, w której znajduje się wartość krotności zmiany efektywności translacji, licząc od 1, jeśli jest więcej niż jedna. Domyślnie 1
<code>-he / --headers</code>	Przełącznik informujący, że kolumny w pliku wejściowym mają nagłówki
<code>threshold</code>	Wartość bezwzględna odcięcia krotności zmiany do analizy
<code>genome</code>	Ścieżka do pliku z sekwencją genomową badanego organizmu w formacie fasta
<code>annotation</code>	Ścieżka do pliku z adnotacjami genomowymi w formacie gtf, zawierającego adnotacje pozycji kodonów start
<code>reactivity</code>	Ścieżka do folderu zawierającego wyniki działania programu MARS-probe, lub innego umożliwiającego odczytanie reaktywności poszczególnych nukleotydów
<code>conditions</code>	Warunki eksperymentów, np. „K” dla próbki kontrolnej
<code>-l / --long</code>	Przełącznik informujący, że w wynikach należy uwzględnić obszar -20/+3 względem kodonu start
<code>-o / --output</code>	Ścieżka do folderu z plikami wynikowymi. Jeśli folder nie istnieje, zostanie stworzony zgodnie z podaną ścieżką.

	Domyślnie „./RIBO_structure_output/”
-r / --RBSfinder	Ścieżka do programu RBS finder. Domyślnie ./rbs_finder.pl
-li / --list	Przełącznik informujący, że należy wygenerować osobny plik z reaktywnościami strukturalnymi mRNA na każdej pozycji osobno

Ogólny schemat działania metody został przedstawiony na Rycinie 16. Pierwszym etapem działania programu jest pobranie i przetworzenie parametrów wejściowych, co umożliwia użytkownikowi dostosowanie sposobu analizy poprzez określenie separatora danych, obecności nagłówek, indeksu kolumny zawierającej wartości krotności zmiany efektywności translacji oraz wybór dodatkowych opcji, takich jak rozszerzona analiza strukturalna obejmująca region długi -20/+3. Program rozpoczyna analizę od wczytania plików wejściowych zawierających wyniki różnicowej analizy efektywności translacyjnej oraz adnotacje genomowe. Na podstawie krotności zmiany efektywności translacji filtruje geny, które spełniają określony próg, przechowując je w dedykowanej strukturze danych. Następnie przetwarzane są adnotacje genomowe z pliku GTF, gdzie dla każdego genu spełniającego kryteria filtrowania, ekstrahowane są kluczowe informacje: nazwa chromosomu, lokalizacja sekwencji kodujących (CDS), pozycje transkryptów, sekwencji 5' UTR oraz kodonów startowych, a także ich orientacja. Metoda wykorzystuje specjalistyczne narzędzie do przewidywania miejsc wiązania rybosomów (RBS) – narzędzie RBSfinder, opisane w rozdziale „Materiały i metody”. Aby uruchomić wymagany jest plik wejściowy o określonej strukturze. Do jego wygenerowania niezbędne są nazwy chromosomów zgodne z tymi zawartymi w pliku sekwencji genomowej, identyfikatory genów, lokalizacje sekwencji CDS oraz orientacja genów. Po przygotowaniu takiego pliku, program RBSfinder analizuje sekwencję genomową w celu identyfikacji potencjalnych miejsc wiązania rybosomu (RBS). Przewidziane lokalizacje RBS są następnie mapowane na odpowiadające im geny, a ich pozycje w stosunku do kodonów startowych są obliczane w celu określenia koordynatów transkryptomowych. Następnie integrowane są profile reaktywności strukturalnej RNA, z których pobierane są dane dotyczące dostępności nukleotydów dla każdego mRNA w różnych warunkach eksperymentalnych, co pozwala na identyfikację różnic strukturalnych potencjalnie związanych z inicjacją translacji.



Rycina 16. Schemat działania programu do badania zależności pomiędzy efektywnością translacji oraz zmianami w dostępności struktury RNA.

Przedostatni etap analizy obejmuje obliczenie różnicy reaktywności między warunkami eksperymentalnymi, identyfikując zmiany w dostępności strukturalnej RNA, które mogą wpływać na translację. W celu podsumowania zmian reaktywności w regionach RBS i kodonu startowego stosowane są miary statystyczne, takie jak mediana i średnia. Dodatkowo opcjonalna analiza ocenia właściwości strukturalne w szerszym zakresie obejmującym 20 nukleotydów przed oraz 3 nukleotydy po pierwszym nukleotydzie kodonu startowego. Na samym końcu dokonywane jest grupowanie genów na podstawie podobieństwa profili różnic w dostępności strukturalnej mRNA. Dane wejściowe dla tej części programu zawierają informacje o różnicach reaktywności RNA w regionach startu translacji i miejscach wiązania rybosomów. Wstępne przetwarzanie danych obejmuje usuwanie brakujących wartości, następnie wykonywane jest grupowanie genów metodą K-means z wybraną liczbą klastrów. Klastrowanie przeprowadzane jest niezależnie dla każdego zestawu danych, tj. RBS, kodonu start oraz regionu -20/+3. Wykorzystanie wizualizacji oraz metod statystycznych umożliwia ocenę korelacji zmian strukturalnych w RNA z efektywnością translacji. Narzędzie generuje kompleksowy zestaw danych łączących zmiany wydajności translacji z cechami strukturalnymi RNA, dostarczając wgląd w mechanizmy regulacyjne wpływające na ekspresję genów. Dzięki integracji adnotacji genomowych, analizy sekwencji, przewidywania RBS oraz profilowania struktury RNA, program umożliwia dogłębne zrozumienie regulacji translacyjnej w odpowiedzi na zmienne warunki komórkowe.

4.1.7. Identyfikacja regulatorów translacji opartych o zmiany strukturalne mRNA

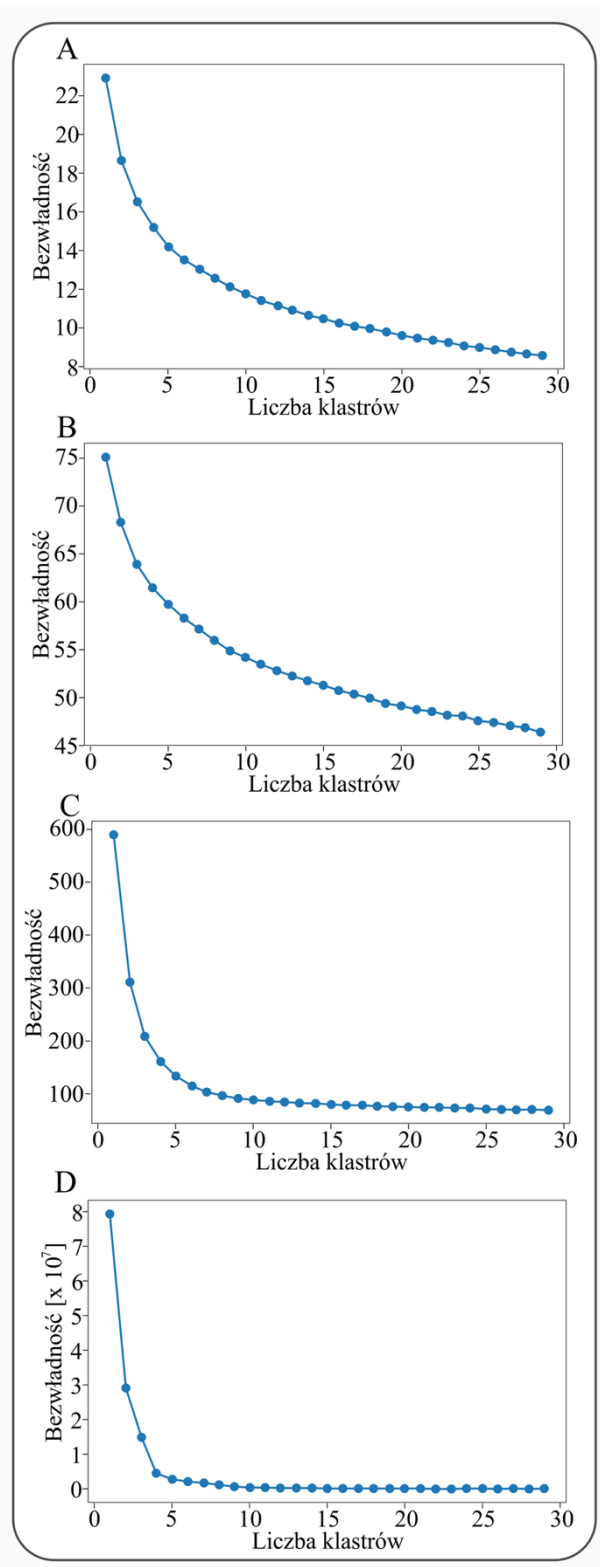
Opisana powyżej metoda została zaaplikowana do analizy zależności pomiędzy indukowanymi antybiotykiem zmianami w efektywności translacji a zmianami w dostępności strukturalnej mRNA. W celu identyfikacji grup genów wykazujących podobne zależności, zastosowano procedurę klasteryzacji uzyskanych wyników. Pierwszym etapem analizy było wygenerowanie wykresów ilustrujących miarę klasteryzacji — bezwładność (*ang. inertia*) (Ryciny 17-19), definiowaną jako sumę odległości obserwacji od najbliższego centroidu (Scikit-learn; Kramer 2016). Niższe wartości bezwładności wskazują na większą spójność klastrów, a jednocześnie mniejsza liczba klastrów sprzyja ich wyraźnemu zróżnicowaniu. Optymalną liczbę klastrów wyznaczano metodą łokcia, identyfikując punkt, w którym dalsze zwiększanie liczby klastrów nie powodowało

istotnego spadku wartości bezwładności. Dla każdej pary warunków eksperymentalnych zastosowano cztery zestawy cech klastrujących, przy czym każdy kolejny zestaw zawierał dodatkowe cechy:

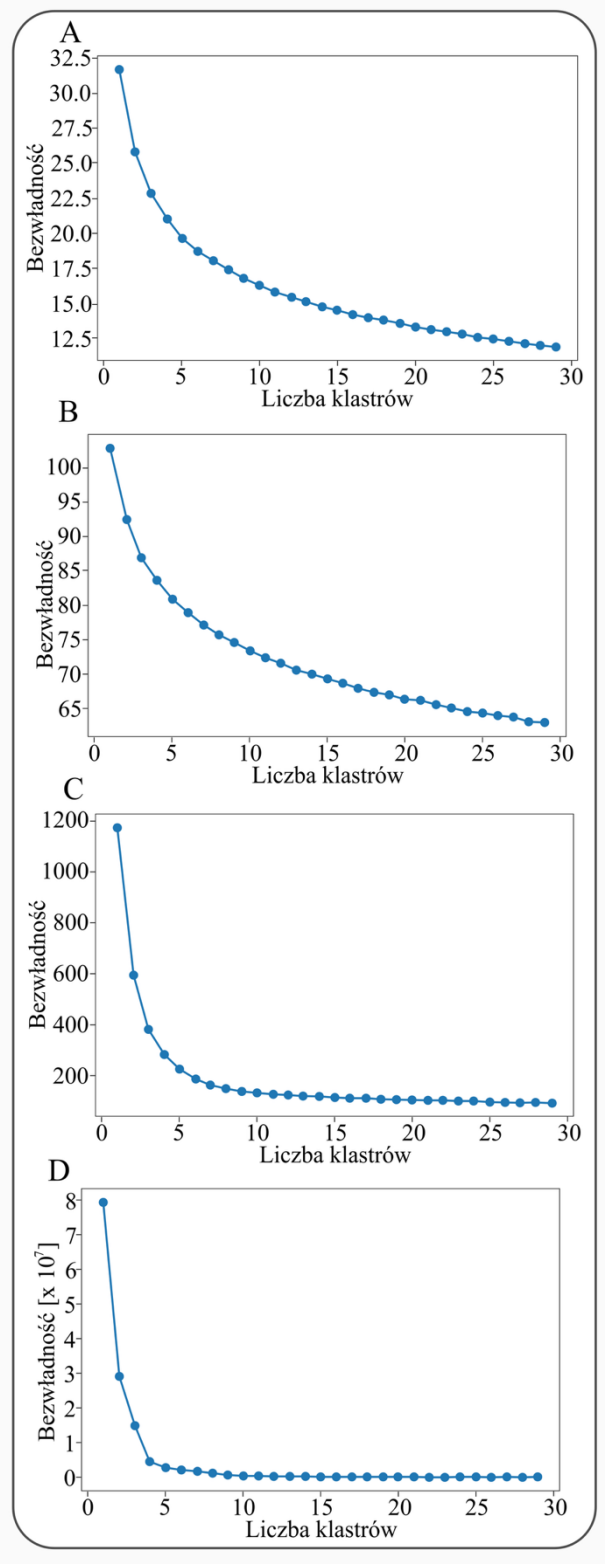
- Zestaw 1: różnice reaktywności nukleotydów pomiędzy warunkami hodowlanymi w obrębie pozycji kodonu start oraz miejsca wiązania rybosomu (RBS) dla każdego genu,
- Zestaw 2: rozszerzony o zmiany reaktywności w regionie -20/+3 względem kodonu start,
- Zestaw 3: dodatkowo uwzględniający zmienność efektywności translacji, wyrażoną jako krotność zmiany pomiędzy analizowanymi warunkami dla każdego genu,
- Zestaw 4: uzupełniony o informację dotyczącą odległości RBS względem kodonu start.

Takie podejście umożliwia identyfikację najbardziej informacyjnych cech biologicznych mających wpływ na translację oraz strukturę RNA.

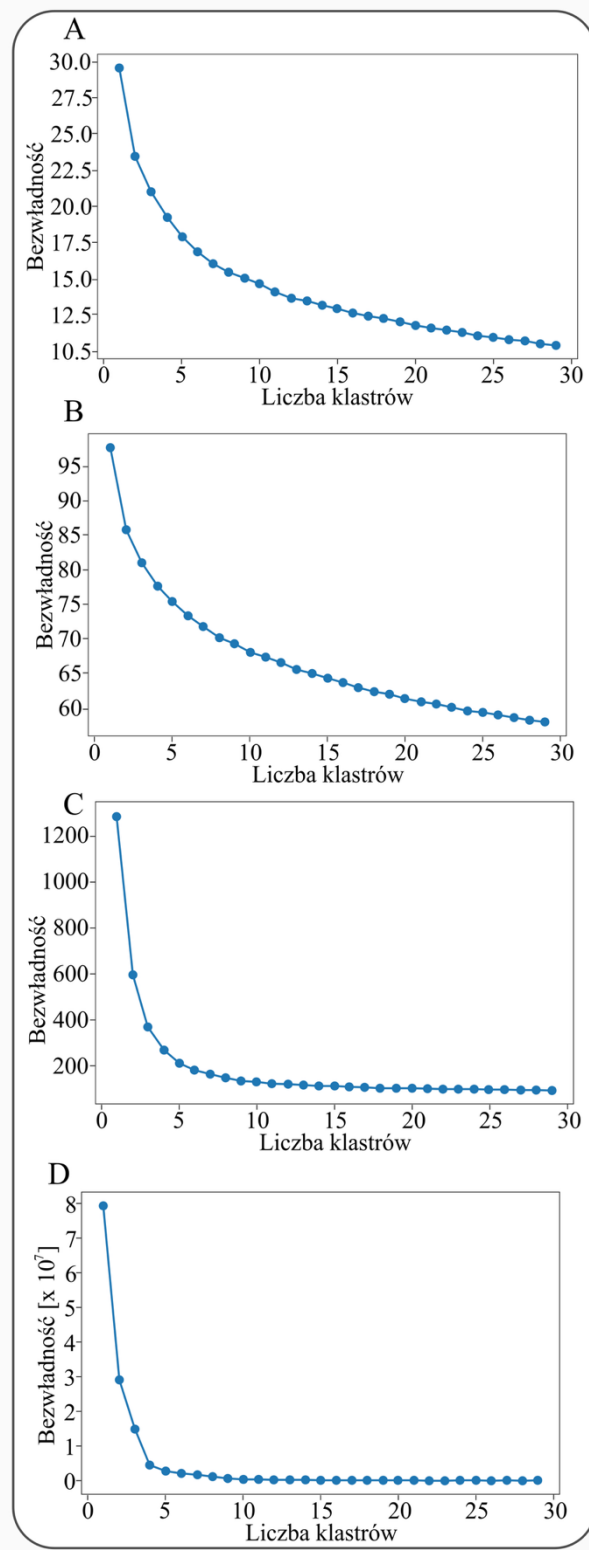
Choć zastosowanie rozbudowanych zestawów cech prowadziło do identyfikacji mniejszej liczby klastrów jako optymalnej, to analiza wykresu obejmującego jedynie zmiany reaktywności nukleotydów w rejonach kodonu start oraz miejsca wiązania rybosomu wykazała najniższą wartość bezwładności (A), świadczącą o najwyższej spójności klasteryzacji. W ramach oceny wpływu zestawu cech użytego do klasteryzacji genów wykonano wizualizację cech uzyskanych klastrów. W celu wyboru optymalnego zestawu cech do klastrowania przeanalizowano rozkład różnic w dostępności strukturalnej w obrębie miejsca wiązania rybosomu i kodonu start w formie wykresów pudełkowych pogrupowanych według zidentyfikowanych klastrów oraz liczby cech.



Rycina 17. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy przedstawiające miarę klasteryzacji dla różnej liczby klastrów dla porównania próby kontrolnej oraz traktowanej cefoksytyną. Metoda lokcia pokazuje jak bezładność, czyli suma odległości punktów od najbliższych centroidów zmienia się wraz z liczbą klastrów. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrowanych: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech.



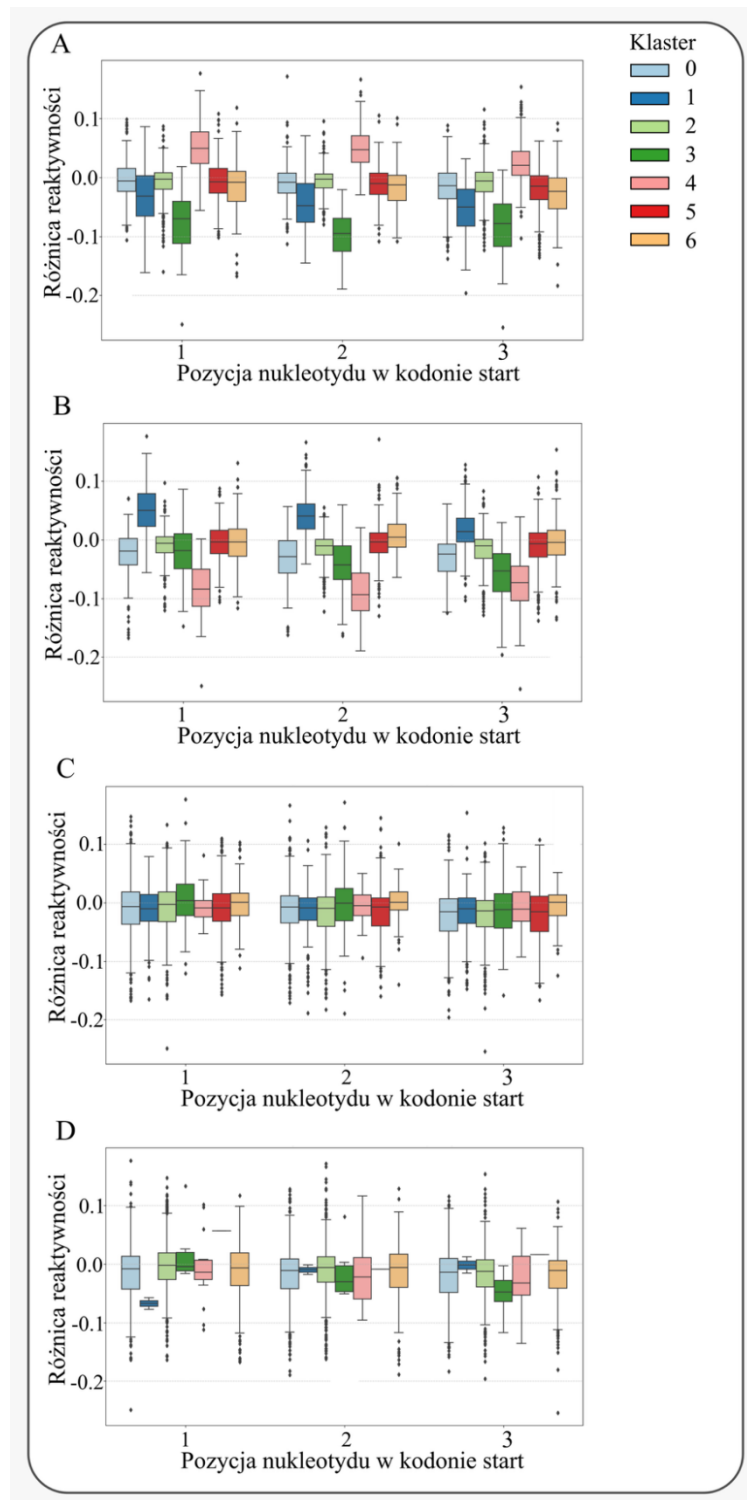
Rycina 18. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy przedstawiające miarę klasteryzacji dla różnej liczby klastrów dla porównania próby kontrolnej oraz traktowanej wankomycyną. Metoda lokcia pokazuje jak bezwnadność, czyli suma odległości punktów od najbliższych centroidów zmienia się wraz z liczbą klastrów. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrowanych: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech.



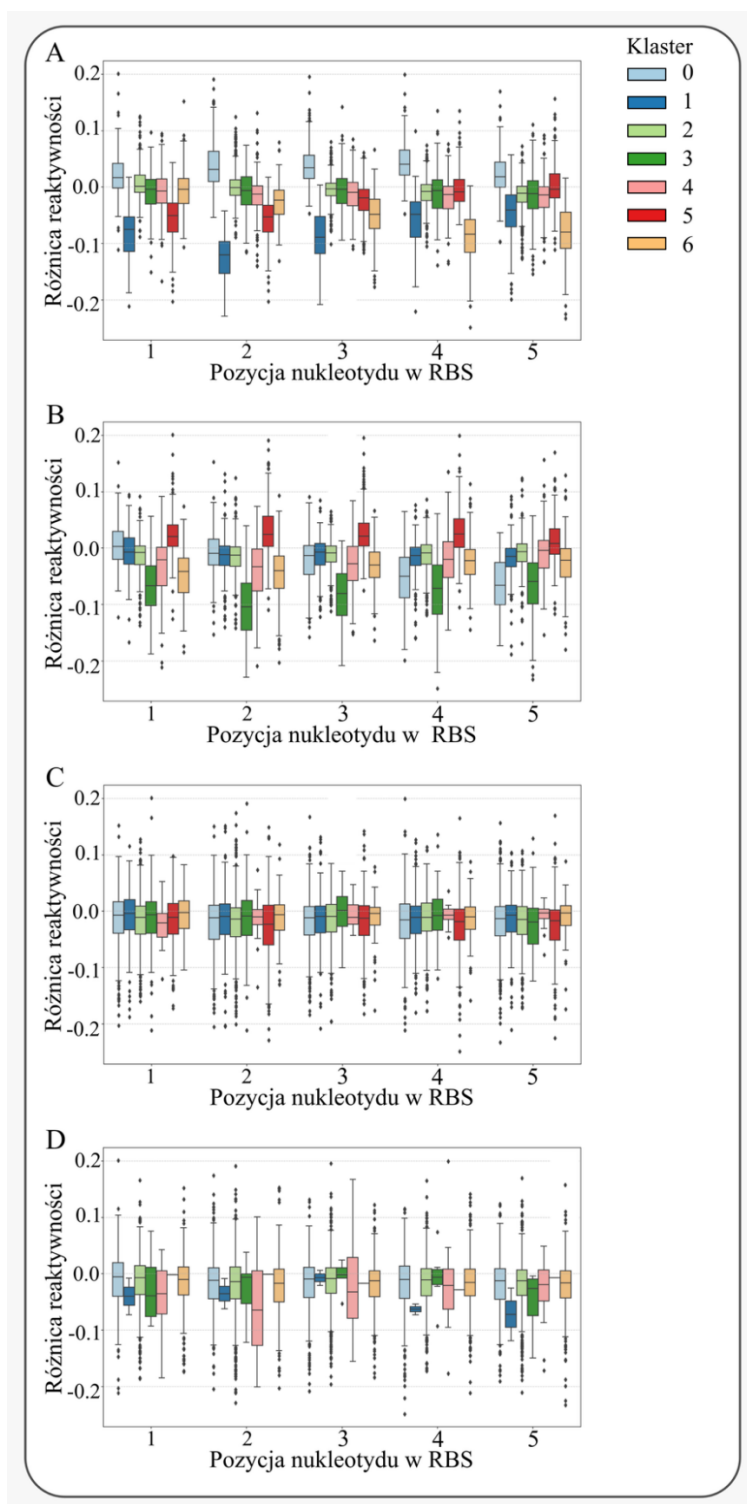
Rycina 19. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy przedstawiające miarę klasteryzacji dla różnej liczby klastrów dla porównania prób traktowanych cefoksytyną oraz wankomycyną. Metoda lokcia pokazuje jak bezładność, czyli suma odległości punktów od najbliższych centroidów zmienia się wraz z liczbą klastrów. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrowanych: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech.

Rycina 20 ilustruje rozkład wartości reaktywności na poszczególnych pozycjach kodonu start, przy czym każdy panel (A–D) reprezentuje klasteryzację opartą na różnej liczbie cech klastrujących. Rycina 21 przedstawia analogiczną analizę dla pozycji w obrębie miejsca wiązania rybosomu (RBS). Na obu rysunkach prezentowane są dane traktowane cefoksytyną i wankomycyną. Wykresy ujawniają wyraźne różnice pomiędzy klastrami, szczególnie widoczne w przypadkach użycia mniejszej liczby cech (A i B) co może sugerować wyższą wartość informacyjną tych wybranych cech. W tych przypadkach wartość bezwładności osiągała także najniższe poziomy, wskazując na bardziej zwarte i wyraźnie oddzielone klastry. Szczególnie wyraźne efekty obserwowano przy wykorzystaniu tylko dwóch cech — reaktywności w pozycjach kodonu start oraz miejscu wiązania rybosomu — co świadczy o ich dużej wartości informacyjnej. Z kolei na wykresie C, obejmującym cztery cechy klastrujące, zauważono najmniejsze zróżnicowanie pomiędzy klastrami. Sugeruje to, że rozszerzenie zestawu cech niekoniecznie prowadzi do lepszej separacji danych, a może wręcz powodować ich większe nakładanie się, utrudniając jednoznaczną interpretację struktury klas. W każdym porównaniu warunków hodowlanych klasteryzacja przebiegała podobnie i klastry prezentowały podobne zależności.

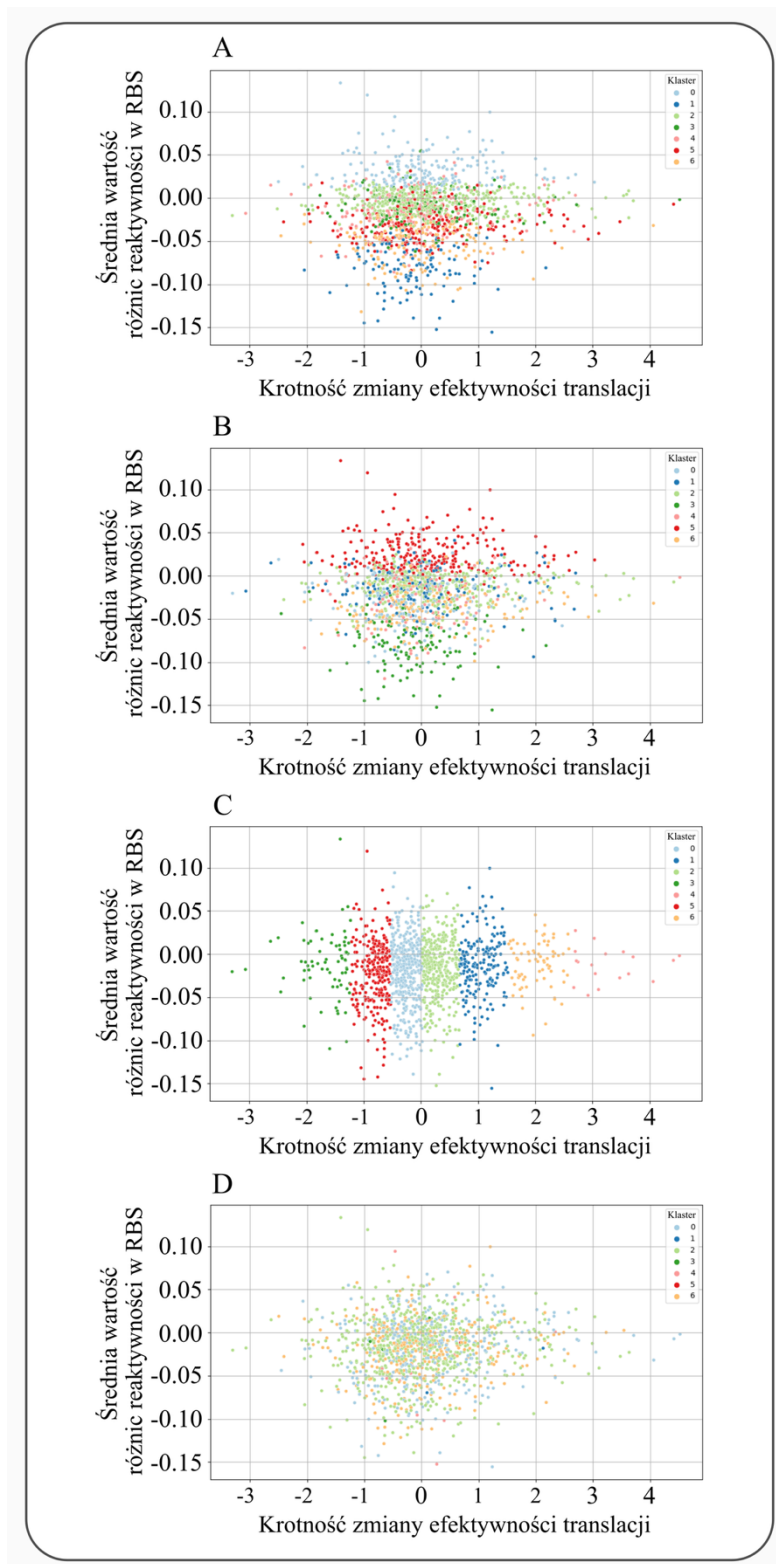
Ostatecznym uzasadnieniem wyboru tylko dwóch cech do klastrowania wyników jest odniesienie średnich różnic reaktywności w kluczowych regionach transkryptu — miejscu wiązania rybosomu (RBS) oraz kodonie start — do wartości krotności zmiany efektywności translacji pomiędzy próbkami traktowanymi cefoksytyną i wankomycyną. Rycina 22 przedstawia wykresy średniej wartości różnic reaktywności w obszarze RBS w odniesieniu do zmian efektywności translacji. Rycina 23 prezentuje analogiczną analizę dla rejonu kodonu start. Dla każdego wariantu klasteryzacji — od dwóch do pięciu cech — nie zaobserwowano zależności pomiędzy poziomem reaktywności a krotnością zmiany efektywności translacji. Tylko w panelu C obu przedstawionych wykresów można zaobserwować wyraźną separację klastrów względem przedziałów wartości krotności zmiany. Jednakże układ ten nie wskazuje na istnienie bezpośredniej zależności pomiędzy zmianami efektywności translacji a zmianami reaktywności. Za tę strukturę klastrów odpowiada fakt, że krotność zmiany efektywności translacji została uwzględniona jako jedna z cech klastrujących, co znacząco wpłynęło na sposób grupowania danych i mogło zdominować efekt innych zmiennych biologicznych. W każdym porównaniu warunków hodowlanych klasteryzacja przebiegała podobnie i klastry prezentowały podobne zależności.



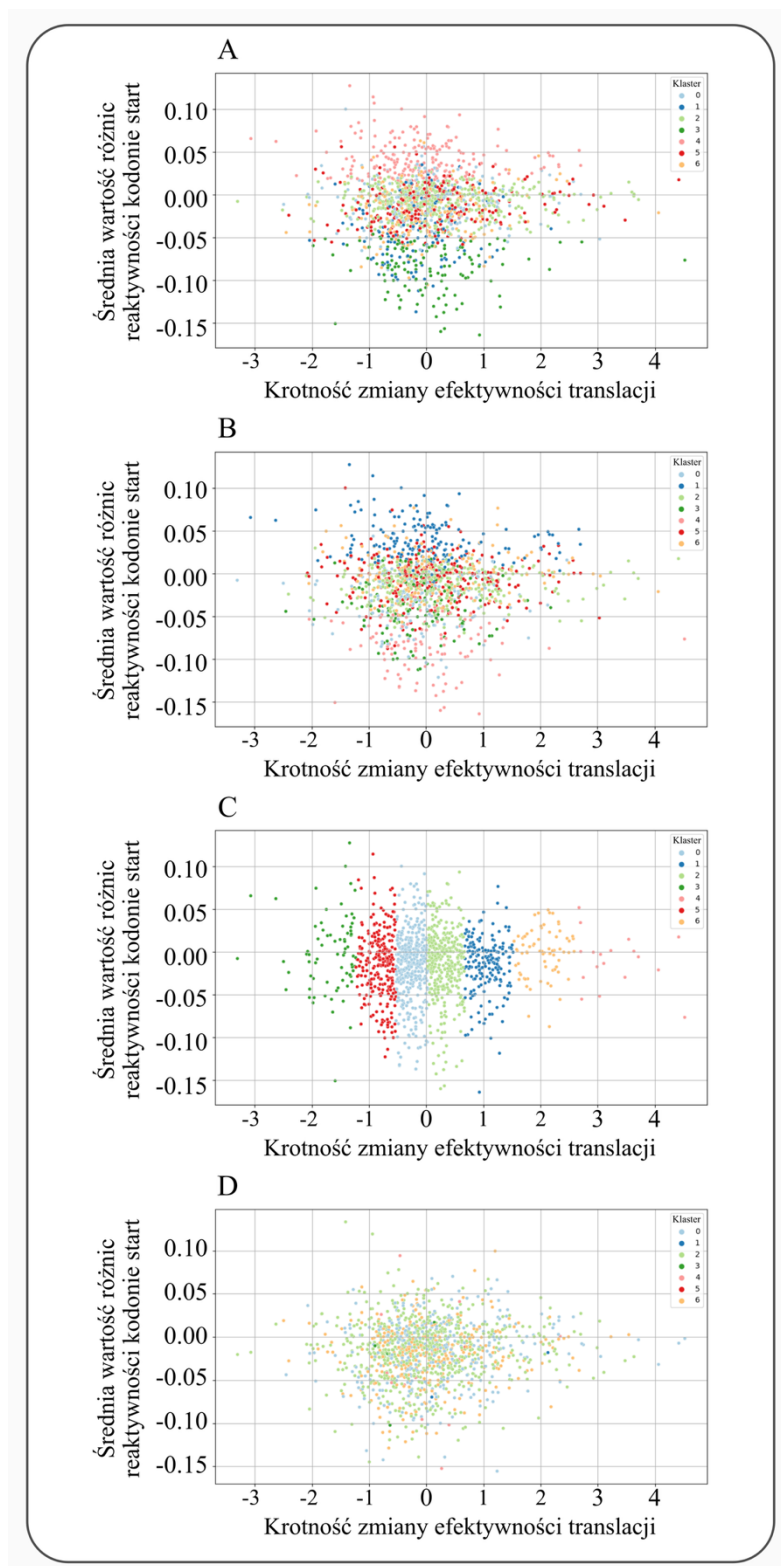
Rycina 20. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy pudełkowe wizualizujące różnice reaktywności pomiędzy próbkami traktowanymi cefoksytyną a próbkami traktowanymi wankomycyną na poszczególnych pozycjach kodonu start pogrupowane według przydzielonych klastrow. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrowujących: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech. Romby oznaczają obserwacje odstające, natomiast ciemna pogrubiona linia wewnątrz każdego pudełka ilustrującego zakres międzykwartyłowy wskazuje medianę.



Rycina 21. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy pudełkowe wizualizujące różnice reaktywności pomiędzy próbkami traktowanymi cefoksytyną a próbkami traktowanymi wankomycyną na poszczególnych pozycjach miejsca wiązania rybosomu pogrupowane według przydzielonych klastrów. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrujących: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech. Romby oznaczają obserwacje odstające, natomiast ciemna pogrubiona linia wewnątrz każdego pudełka ilustrującego zakres międzykwartyłowy wskazuje medianę.

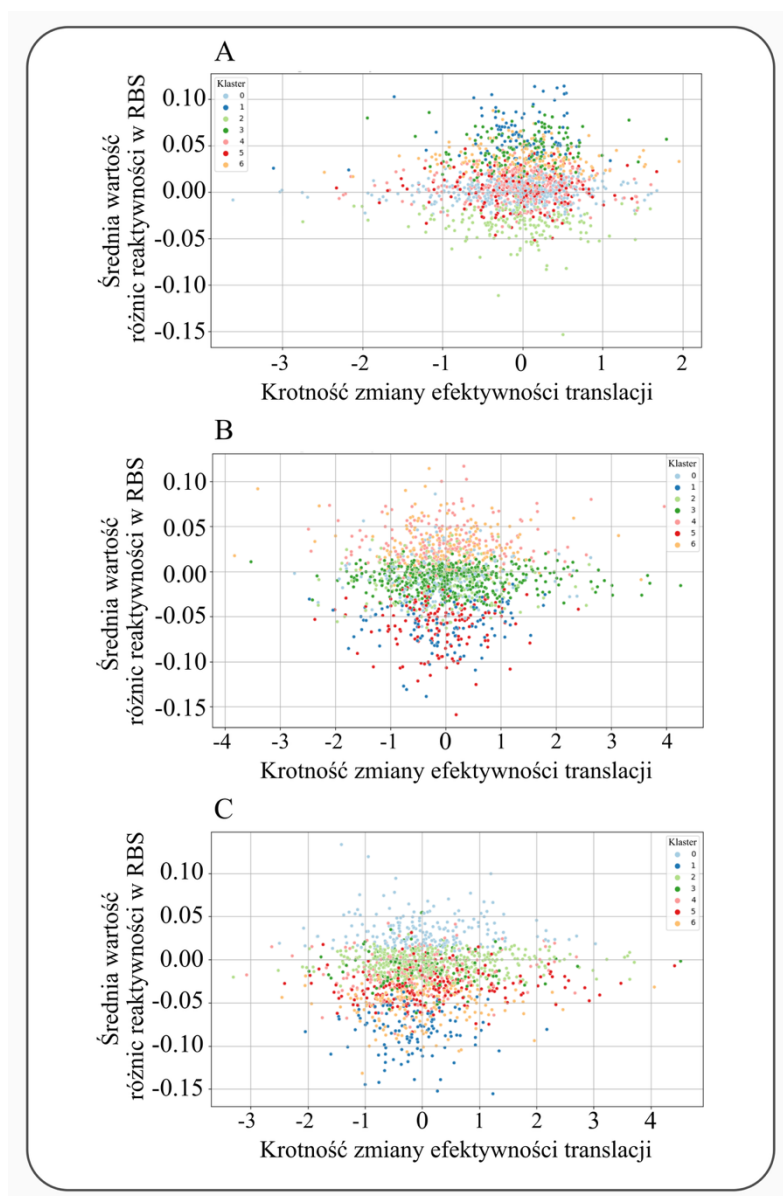


Rycina 22. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy przedstawiające średnią wartość różnic reaktywności w miejscu wiązania rybosomu w odniesieniu do wartości krotności zmiany efektywności translacji pomiędzy danymi z próbek traktowanych cefoksytyną i wankomycyną. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrujących: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech.

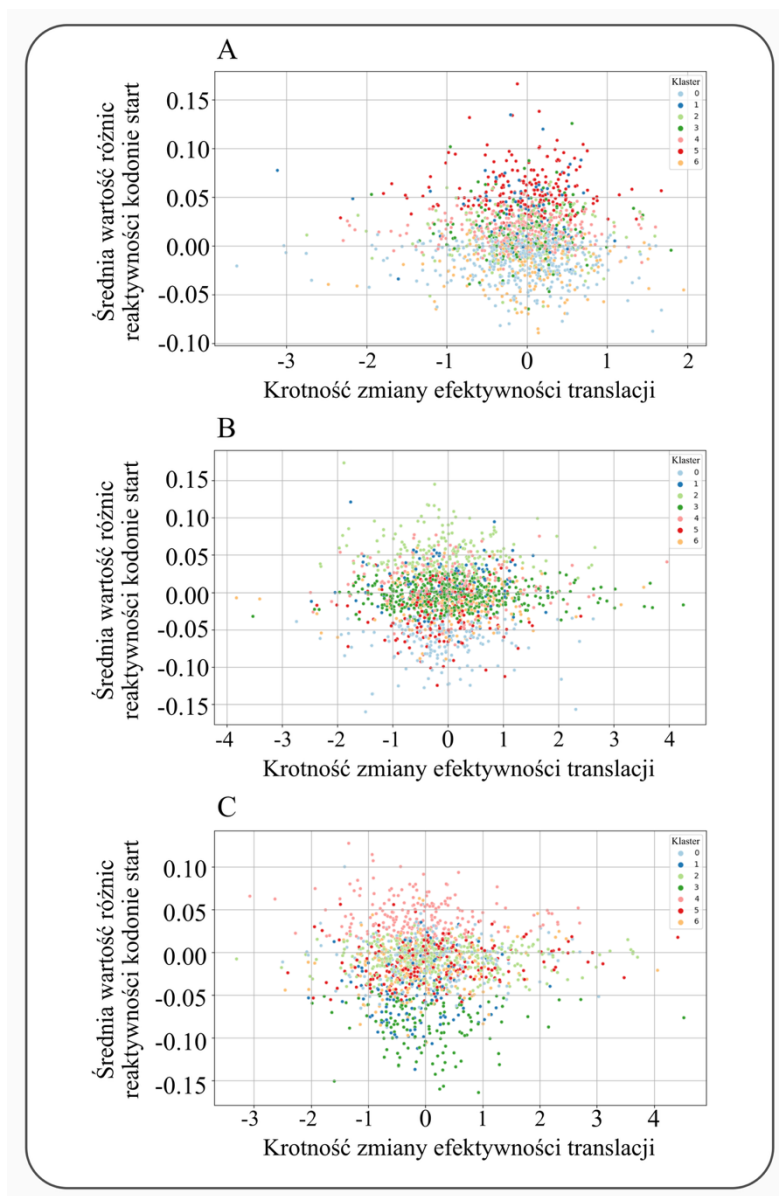


Rycina 23. Wyniki optymalizacji protokołu klastrowania. Wykresy przedstawiające średnią wartość różnic reaktywności w miejscu kodonu start w odniesieniu do wartości krotności zmiany efektywności translacji pomiędzy danymi z próbek traktowanych cefoksytyną i wankomycyną. Każdy wykres odpowiada klasteryzacji przeprowadzonej na podstawie różnych zbiorów cech klastrujących: A. Dwie cechy; B. Trzy cechy; C. Cztery cechy; D. Pięć cech.

W celu oceny potencjalnego związku między zmianami struktury drugorzędowej RNA w rejonach inicjacji translacji a zmiennością efektywności translacji, przeanalizowano średnie różnice reaktywności w miejscach wiązania rybosomu (Rycina 24) oraz w kodonach start (Rycina 25) z zastosowaniem zoptymalizowanego protokołu klastrowania. Wykresy (Ryciny 24-25) przedstawiają dane porównawcze dla trzech kombinacji warunków hodowlanych: kontrola vs. cefoksytyna (A), kontrola vs. wankomycyna (B) oraz cefoksytyna vs. wankomycyna (C). Przeprowadzona analiza nie ujawnia jednoznacznego trendu wskazującego na korelację pomiędzy zmianami efektywności translacji a dostępnością strukturalną rejonów mRNA. Wśród analizowanych genów zaobserwowano zarówno przypadki, w których zwiększona reaktywność strukturalna w obszarach inicjacji translacji wiązała się ze wzrostem efektywności translacji, jak i takie, w których wzrost dostępności strukturalnej towarzyszył spadkowi translacji. Ponadto, występują również sytuacje odwrotne, gdzie obniżenie reaktywności odpowiadało wyższej efektywności translacji oraz przypadki, w których oba parametry zmieniały się w przeciwnych kierunkach. Wyniki te sugerują, że relacja pomiędzy strukturą RNA a translacją może być złożona i zależna od dodatkowych czynników kontekstowych. W stosunku do wyników zmian efektywności translacji pomiędzy kontrolą oraz próbką traktowaną cefoksytyną widoczna jest większa różnica w efektywności translacji pomiędzy próbką traktowaną wankomycyną a kontrolną i traktowaną cefoksytyną. Zmiana ta jest widoczna w krotności zmiany efektywności translacji większej od 2 co oznacza, że efektywność translacji niektórych genów w próbce traktowanej wankomycyną była mniejsza niż w próbce kontrolnej oraz traktowanej cefoksytyną.



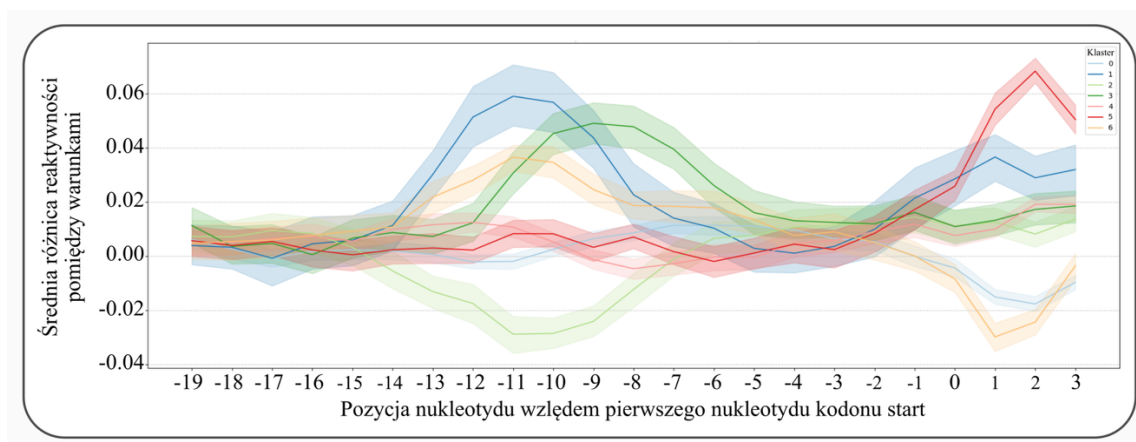
Rycina 24. Wykresy przedstawiające średnią wartość różnic w reaktywności pomiędzy warunkami hodowlanymi w miejscach wiązania rybosomu w odniesieniu do zmienności efektywności translacji. A. Kontrola vs. Cefoksytyna; B. Kontrola vs. Wankomycyna; C. Cefoksytyna vs. Wankomycyna.



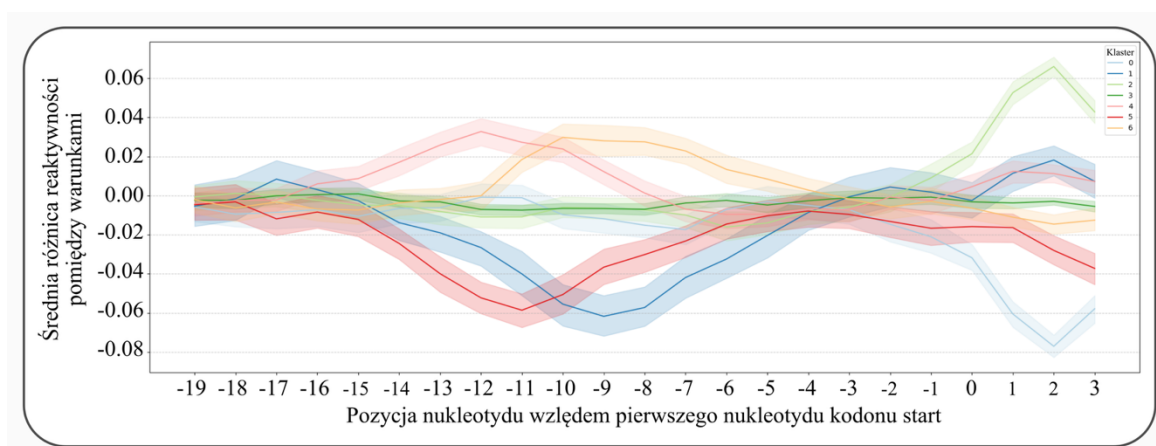
Rycina 25. Wykresy przedstawiające średnią wartość różnic w reaktywności pomiędzy warunkami hodowlanymi w kodonach start w odniesieniu do zmienności efektywności translacji. A. Kontrola vs. Cefoksytyna; B. Kontrola vs. Wankomycyna; C. Cefoksytyna vs. Wankomycyna.

W celu oceny wpływu warunków hodowlanych na strukturę drugorzędową RNA w rejonach inicjacji translacji wykonano zestawienie średnich różnic reaktywności na poziomie nukleotydowym w obrębie pozycji -20/+3 względem kodonu start. Dane zostały pogrupowane według wyznaczonych wcześniej klastrów, dla poszczególnych porównań warunków eksperymentalnych (Rycina 26 – kontrola vs. cefoksytyna, Rycina 27 – kontrola vs. wankomycyna, Rycina 28 – cefoksytyna vs. wankomycyna). Ponieważ klastrowanie zostało przeprowadzone niezależnie dla każdej pary warunków, kolory przypisane do

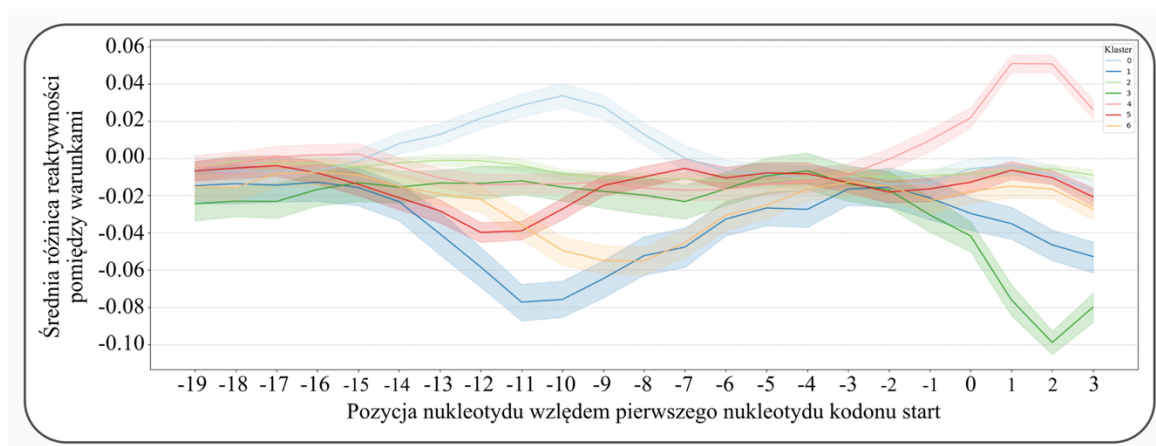
klastrów nie odpowiadają sobie pomiędzy wykresami Rycin 26 - 28. Ułatwiają one jedynie separację genów o zbliżonych profilach reaktywności.



Rycina 26. Średnia różnica reaktywności pomiędzy próbką kontrolną a traktowaną cefoksytyną dla genów zgrupowanych według wyznaczonych klastrów na każdej pozycji -20/+3 względem kodonu start. Obszar zacieniony wokół linii reprezentuje 95% przedział ufności.



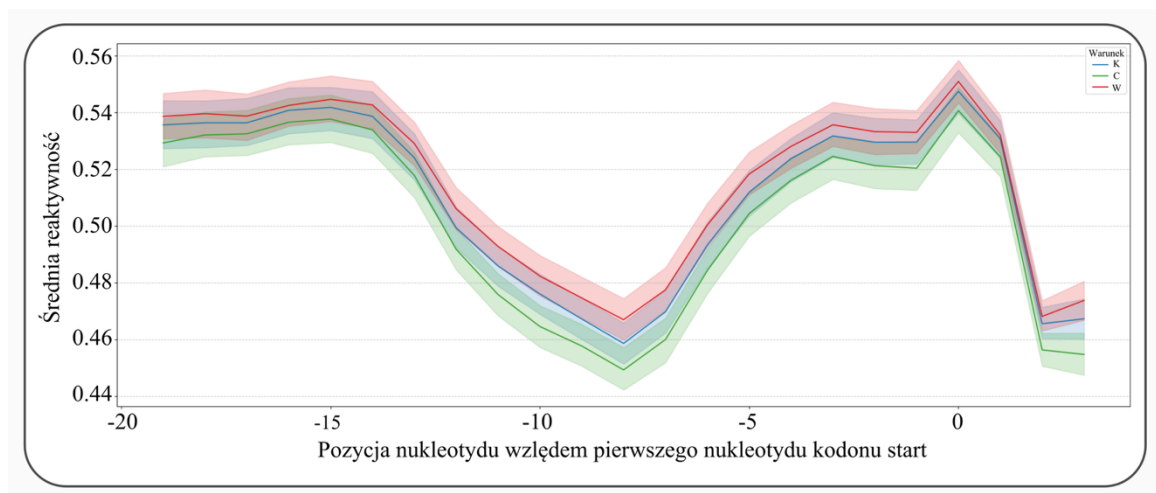
Rycina 27. Średnia różnica reaktywności pomiędzy próbką kontrolną a traktowaną wankomycyną dla genów zgrupowanych według wyznaczonych klastrów na każdej pozycji -20/+3 względem kodonu start. Obszar zacieniony wokół linii reprezentuje 95% przedział ufności.



Rycina 28. Średnia różnica reaktywności pomiędzy próbką traktowaną cefoksytyną a traktowaną wankomycyną dla genów zgrupowanych według wyznaczonych klastrów na każdej pozycji -20/+3 względem kodonu start. Obszar zacieniony wokół linii reprezentuje 95% przedział ufności.

Uwzględniając, że RBS przeważnie zlokalizowany jest w odległości 5-10 nukleotydów przed kodonem start (Omotajo i in.2015), na podstawie wykresów na rycinach 28-30 można zaobserwować, że zmiany reaktywności strukturalnej RNA w różnych warunkach środowiskowych są najwyższe właśnie w rejonie RBS oraz kodonu start. Jednakże nawet w tych rejonach obserwowane różnice nie są funkcjonalnie znaczące (zawierają się w przedziale -0,1 do +0,05). Obserwacja ta jest spójna z tym, że wartości reaktywności strukturalnej zmierzonej w każdym z warunków oscylują w przedziale 0,4 do 0,6, który interpretowany jest jako wartości odpowiadające strukturom dynamicznym (Rycina 29). Na wykresie z ryciny 26 przedstawiającym trendy w różnicach reaktywności pomiędzy kontrolą a próbą traktowaną cefoksytyną klaster 1 reprezentuje geny które wykazują wyższą reaktywność zarówno przed rejonem RBS i w rejonie kodonu start w próbie kontrolnej niż w próbie traktowanej cefoksytyną. Klaster 3 charakteryzuje się zwiększoną reaktywność w próbie kontrolnej jedynie przed RBS z kolei klaster 5 wykazuje podwyższoną reaktywność w kontroli jedynie w miejscu kodonu start. Geny przypisane do klastra 2 prezentują niższą reaktywność przed rejonem wiązania RBS w próbie kontrolnej względem próby traktowanej cefoksytyną, a w przypadku klastra 0, obniżona reaktywność występuje w kontroli w obszarze kodonu start. Brak odchyień w żadną ze stron wykazują geny w klastrze 4, a klastrze 6 zaobserwowano wyższą reaktywność strukturalną w próbie kontrolnej przed rejonem RBS, przy jednoczesnym spadku reaktywności w okolicy kodonu start w porównaniu do próby traktowanej cefoksytyną.

W porównaniu kontroli do próby traktowanej wankomycyną (Rycina 27) widoczne są podobne trendy, jednakże nie został wyodrębniony klaster charakteryzujący się zwiększoną reaktywnością w kontroli zarówno w rejonie RBS jak i w miejscu kodonu startowego, podobny profilem jest klaster 4, ale różnica w miejscu kodonu startowego nie jest aż tak wyraźna. Dwa klastry wykazują większą reaktywność tylko przed miejscem wiązania rybosomu (klaster 6) lub tylko w obrębie kodonu startowego (klaster 2). Geny przypisane do klastra 0 mają niższą reaktywność strukturalną w kontroli koło kodonu start natomiast te z klastra 5 zarówno w rejonie RBS jak i okolicy kodonu startowego. W pierwszym klastrze reaktywność w próbie kontrolnej jest niższa w miejscu wiązania rybosomu natomiast wzrasta w obszarze kodonu start. Klaster genów niewykazujących zmian na przestrzeni nukleotydów opisanych na wykresie to klaster 3. Uwzględniając porównanie próbek traktowanych cefoksytiną i wankomycyną, przedstawione na wykresie z Ryciny 28, zaobserwowano następujące profile reaktywności: klaster 0 charakteryzuje się wyższą reaktywnością w próbie traktowanej cefoksytiną przed miejscem wiązania rybosomu (RBS); geny przypisane do klastra 1 wykazują obniżoną reaktywność w tym samym rejonie oraz w okolicy kodonu start w porównaniu z próbkami traktowanymi wankomycyną; klaster 2 nie wykazuje istotnych różnic w reaktywności między warunkami hodowlanymi, wskazując na względną stabilność strukturalną RNA w badanym rejonie; w klastrze 3 obserwuje się niższą reaktywność w próbie traktowanej cefoksytiną w bezpośrednim otoczeniu kodonu start; w klastrze 4 zwiększona reaktywność w tym obszarze jest wyraźniejsza właśnie w próbie cefoksytynowej; klaster 5 ujawnia nieznacznie wyższą reaktywność w próbie traktowanej wankomycyną przed regionem RBS; klaster 6 wykazuje podobny wzorzec, lecz dotyczący alternatywnych nukleotydów w tym samym obszarze. Zaobserwowane wzorce reaktywności wskazują na zróżnicowany wpływ cefoksytyny i wankomycyny na strukturę drugorzędową RNA w rejonach związanych z inicjacją translacji.



Rycina 29. Wykres średnich reaktywności strukturalnej na pozycjach -20/+3 względem kodonu start dla wyników ze wszystkich trzech warunków hodowlanych. Linia czerwona – próba traktowana wankomycyną, linią zieloną – próba traktowana cefoksytyną, linia niebieska – próba kontrolna. Średnia reaktywność w przedstawionym obszarze dla genów we wszystkich próbkach prezentuje podobne wartości w takim samym trendzie. Obszar zacieniony wokół linii reprezentuje 95% przedział ufności.

Na wykresie liniowym (Rycina 29) przedstawiono średnie wartości reaktywności w zależności od pozycji względem kodonu start, wraz z wstęgą reprezentującą przedział ufności (CI, *ang. confidence interval*). Wstęga ta ilustruje zakres niepewności wokół średniej reaktywności dla każdej pozycji, przy czym domyślnie odpowiada 95% przedziałowi ufności. Oznacza to, że z 95% prawdopodobieństwem rzeczywista wartość średnia znajduje się w obrębie wyznaczonego obszaru. Szerokość wstęgi odzwierciedla zmienność danych oraz liczebność próby — szerszy przedział wskazuje na większą niepewność lub mniejszą liczbę obserwacji, natomiast węższy sugeruje większą precyzję estymacji średniej reaktywności. Biorąc pod uwagę, że skala reaktywności mieści się w przedziale od 0 do 1, przedział ufności o szerokości 0,2 wskazuje na umiarkowaną precyzję estymacji — rzeczywista wartość średnia może się różnić od wartości obserwowanej nawet o 20%.

W celu identyfikacji wspólnych trendów w zmianach efektywności translacji (ET) oraz dostępności struktury drugorzędowej RNA, geny zostały pogrupowane według czterech ćwiartek wykresu, odpowiadających kombinacjom wartości zmiany efektywności translacji (FC) i reaktywności strukturalnej:

- Grupa A (II ćwiartka): $FC < 0$, reaktywność > 0
- Grupa B (I ćwiartka): $FC > 0$, reaktywność > 0

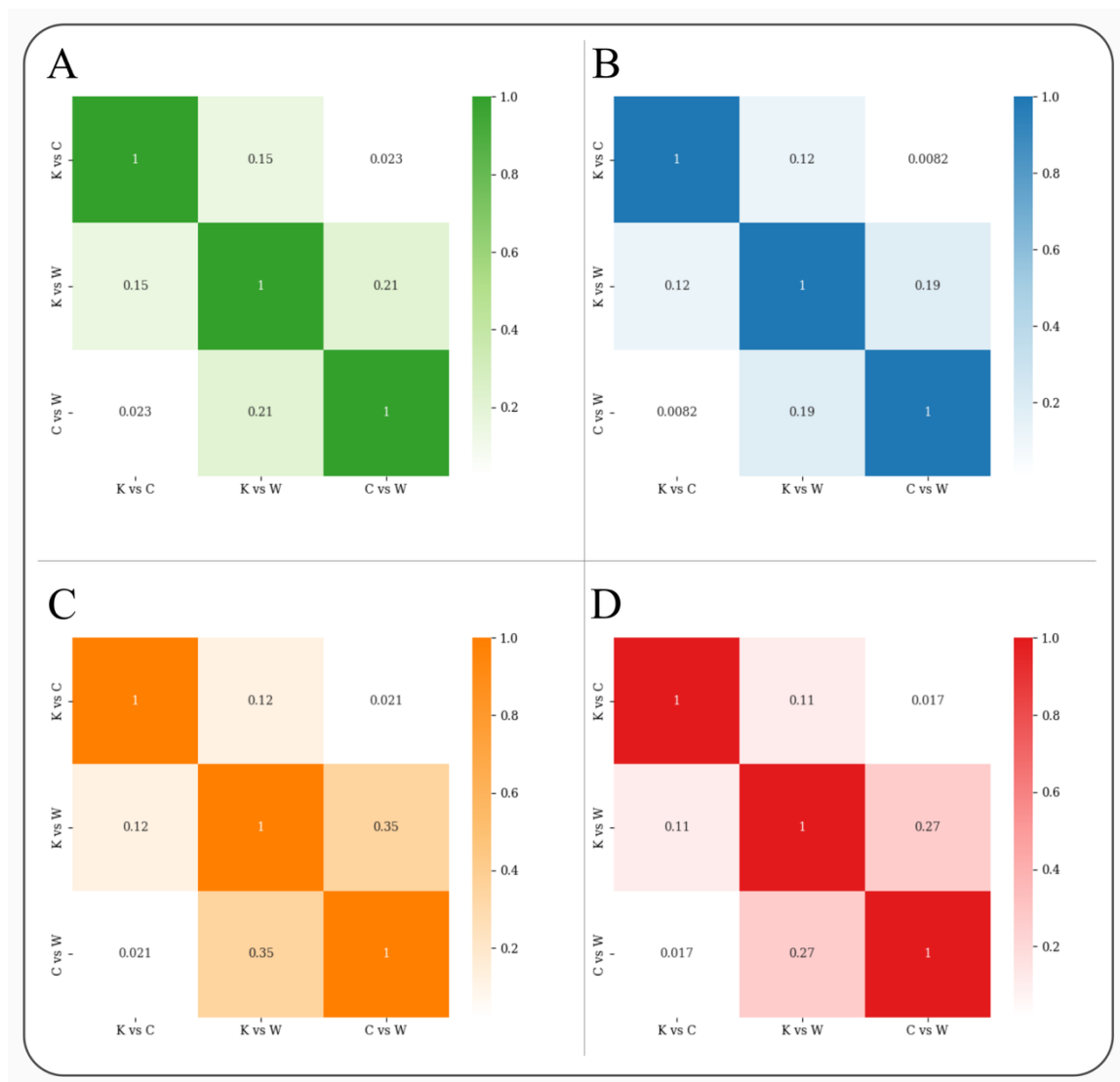
- Grupa C (III ćwiartka): $FC < 0$, reaktywność < 0
- Grupa D (IV ćwiartka): $FC > 0$, reaktywność < 0

Każda z grup reprezentuje odmienną zależność pomiędzy efektywnością translacji a dostępnością struktury RNA w regionach kodonu startowego oraz sekwencji RBS, w kontekście porównania warunku pierwszego (np. kontrola vs. próby traktowane lub cefoksytyna vs. wankomycyna):

- Grupa A: obniżona ET przy zwiększonej dostępności RNA
- Grupa B: podwyższona ET przy zwiększonej dostępności RNA
- Grupa C: obniżona ET przy zmniejszonej dostępności RNA
- Grupa D: podwyższona ET przy zmniejszonej dostępności RNA

Wyniki zostały przedstawione na Rycinie 30, zawierającej mapy cieplne ilustrujące zależności pomiędzy grupami genów w czterech panelach (A–D), odpowiadających powyższym klasyfikacjom. Wartości korelacji (np. między kontrolą a wankomycyną, czy cefoksytyną a wankomycyną) są obliczane dla każdej grupy genów osobno, ale nie między samymi grupami. Szczególnie interesujące są grupy B i C, które wykazują zgodne trendy w zakresie translacji i reaktywności strukturalnej. Może to sugerować, że konformacyjne zmiany w obrębie miejsca inicjacji translacji odgrywają istotną rolę w regulacji procesu translacyjnego.

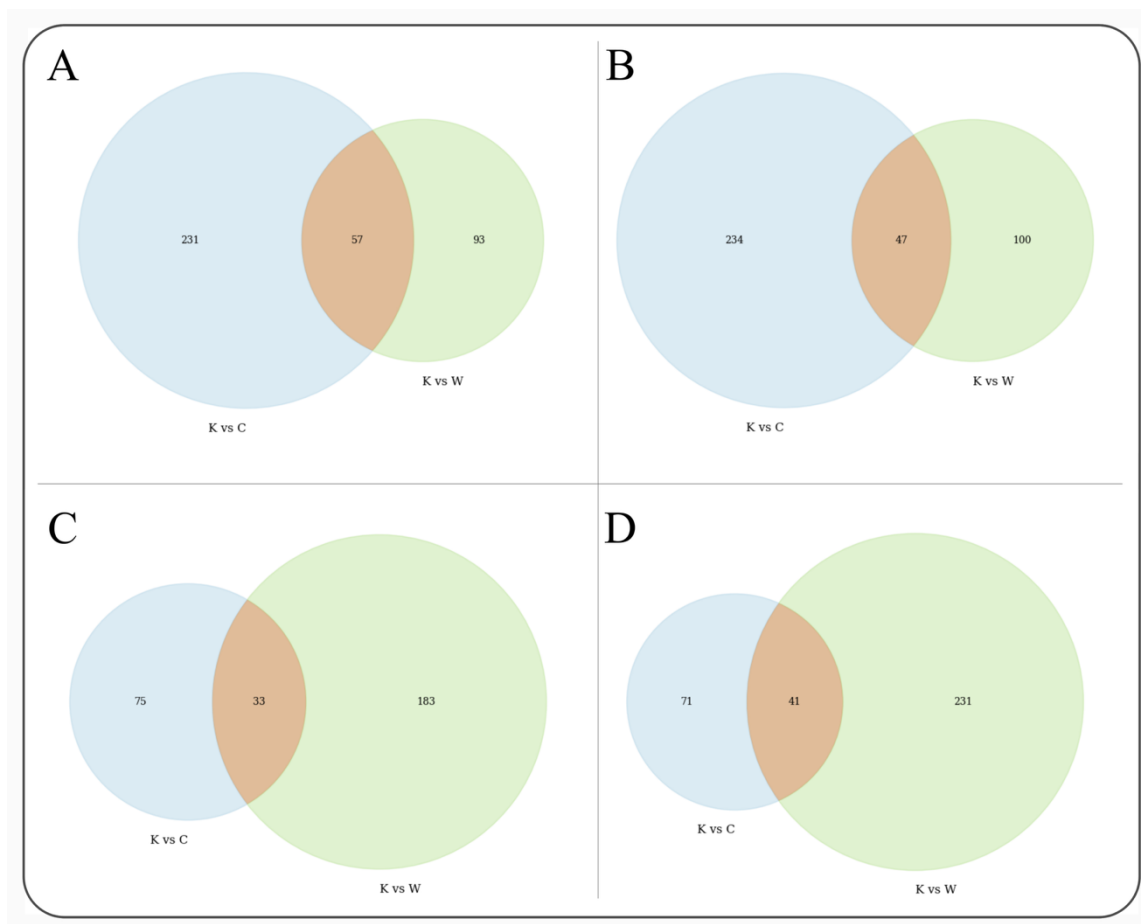
Brak wyraźnie wyróżniającej się korelacji w żadnej z grup (A–D) wskazuje, że nawet w obrębie genów o podobnych trendach translacyjno-strukturalnych, odpowiedź na warunki hodowlane jest zróżnicowana. Najwyższa korelacja (0,35) obserwowana w grupie C może sugerować, że geny z obniżoną efektywnością translacji i zmniejszoną dostępnością RNA reagują na warunki w sposób bardziej spójny — szczególnie w porównaniu C vs W i K vs W. Korelacja jest wyższa dla porównań kontrola vs wankomycyna (KW) i cefoksytyna vs wankomycyna (CW) — średnio 0,26 (od 0,19 w grupie B do 0,35 w grupie C) — niż dla porównań KW vs KC (kontrola vs cefoksytyna), gdzie średnia wynosi 0,13 (od 0,11 w grupie D do 0,15 w grupie A). Brak silnej korelacji między warunkami w grupach, które reprezentują zgodne kierunki zmian ET i dostępności RNA może wynikać z różnic w mechanizmach działania antybiotyków lub z udziału dodatkowych czynników regulacyjnych, takich jak białka wiążące RNA, sRNA czy lokalne motywy strukturalne.



Rycina 30. Korelacja pomiędzy zestawieniami warunków hodowlanych w postaci genów, które zgrupowane są według czterech warunków A. $FC < 0$, reaktywność > 0 ; B. $FC > 0$, reaktywność > 0 ; C. $FC < 0$, reaktywność < 0 ; D. $FC > 0$, reaktywność < 0 . W każdym panelu największą korelację wykazują wyniki analizy próby traktowanej wankomycyną w odniesieniu do próby traktowanej cefoksytyną oraz kontrolnej.

Identyfikacja genów wykazujących spójną odpowiedź strukturalno-translacyjną może stanowić podstawę do wyodrębnienia funkcjonalnych modułów regulacyjnych, aktywowanych niezależnie od rodzaju stresu środowiskowego. W celu oceny potencjalnej wspólnoty tych mechanizmów, porównano listy genów należących do każdej z czterech grup (A–D), uwzględniając zestawienia warunków traktowanych względem kontroli (K vs C oraz K vs W). Analiza wykazała zarówno geny unikalne dla poszczególnych porównań, jak i zestawy wspólne, co może wskazywać na obecność uniwersalnych szlaków regulacyjnych reagujących na zaburzenia translacyjne i strukturalne niezależnie od typu

czynnika stresowego – w klasy antybiotyku. Wyniki tej analizy zostały przedstawione na diagramie Venn'a (Rycina 31).



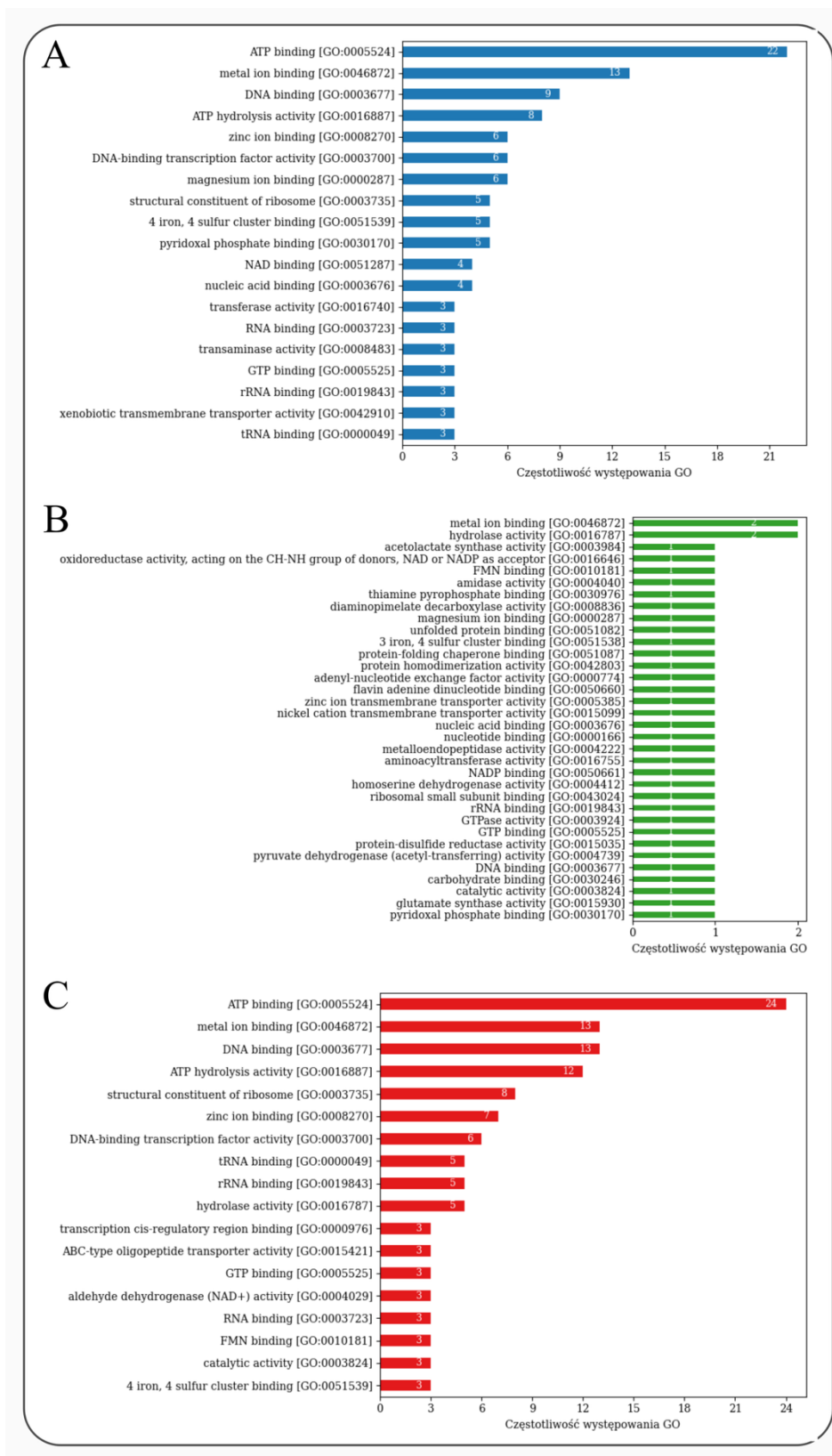
Rycina 31. Zbiory wspólne i rozłączne pomiędzy genami zgrupowanymi według czterech trendów zmian translacyjno-strukturalnych w porównaniu prób traktowanych antybiotykiem z kontrolną. A. $FC < 0$, reaktywność > 0 ; B. $FC > 0$, reaktywność > 0 ; C. $FC < 0$, reaktywność < 0 ; D. $FC > 0$, reaktywność < 0 .

Analiza wykazała, że w odpowiedzi na cefoksytynę przeważały geny o niższej reaktywności strukturalnej niż w warunku kontrolnym. Natomiast w przypadku wankomycyny dominowały geny o wyższej reaktywności strukturalnej względem kontroli. W obu przypadkach zmiany reaktywności były niezależne od zmian w translacji. Sugeruje to, że konformacyjne zmiany w obrębie regionu inicjacji translacji mogą zachodzić autonomicznie względem translacyjnej regulacji, a ich charakter może być specyficzny dla rodzaju stresu antybiotykowego. Wyniki te stanowiły punkt wyjścia do pogłębionej analizy istotności różnic w reaktywności strukturalnej pomiędzy warunkami hodowlanymi.

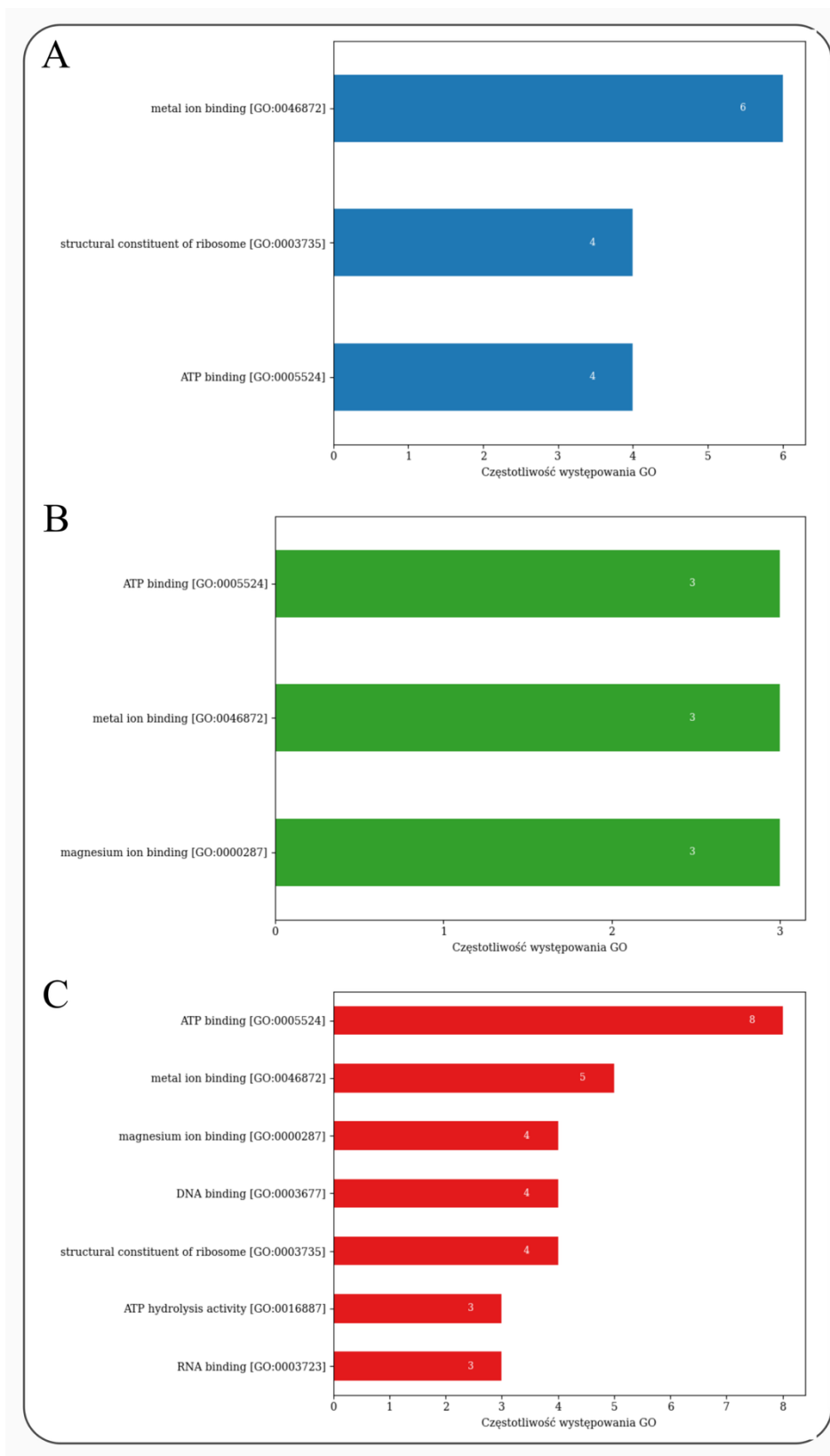
W celu identyfikacji genów o statystycznie istotnych zmianach w reaktywności nukleotydów w miejscach inicjacji translacji i jednocześnie wykazujących jednakowy trend

zmiany w regionie kodonu start i miejscu wiązania rybosomu oraz zmianie efektywności translacji połączono wyniki analizy trendów translacyjno-strukturalnych z wynikami analizy istotności zmian w reaktywności. Dla każdego porównania kontroli z próbą traktowaną wybrano dwie grupy genów, które identyfikowane są jako korelacja pomiędzy zmiennością efektywności translacji oraz dostępności strukturalnej. W założeniu, jeśli efektywność translacji maleje to obniża się także reaktywność nukleotydów i odwrotnie, przy wzroście efektywności translacji, dostępność strukturalna miejsca inicjacji translacji także jest wyższa. Tylko jeden gen (SAV_RS13505), o statystycznie istotnej różnicy średniej reaktywności w porównaniu wankomycyny do kontroli wykazuje dodatni trend w obu miarach. Genów o przeciwnym trendzie znaleziono pięć. Jeden w odpowiedzi na cefoksytynę (SAV_RS09475) i cztery w odpowiedzi na wankomycynę (SAV_RS07840, SAV_RS08360, SAV_RS09605, SAV_RS11290). Geny te zostały wcześniej opisane w podrozdziale 4.1.5. Negatywny trend świadczy o tym, że translacja tych genów oraz ich dostępność strukturalna w miejscu inicjacji translacji były wyższe w próbie traktowanej w stosunku do kontrolnej. Jest zgodne z funkcją biologiczną produktów białkowych tych genów. Wspólnym mianownikiem dla analizowanych białek: regulatora transkrypcji z rodziny MarR, białka Tex, białka zawierającego domenę nukleazową (NERD), białka wiążącego penicylinę PBP2 oraz helikazy DinG, jest ich udział w mechanizmach adaptacyjnych bakterii do warunków stresowych. Białka MarR i Tex pełnią funkcje regulatorowe, kontrolując ekspresję genów związanych z odpowiedzią na czynniki środowiskowe, w tym obecność antybiotyków i stres oksydacyjny. DinG oraz NERD uczestniczą w utrzymaniu integralności genomu poprzez naprawę i obróbkę DNA, co jest kluczowe w warunkach genotoksycznych. Z kolei PBP2 warunkuje oporność na antybiotyki β -laktamowe poprzez modyfikację struktury ściany komórkowej.

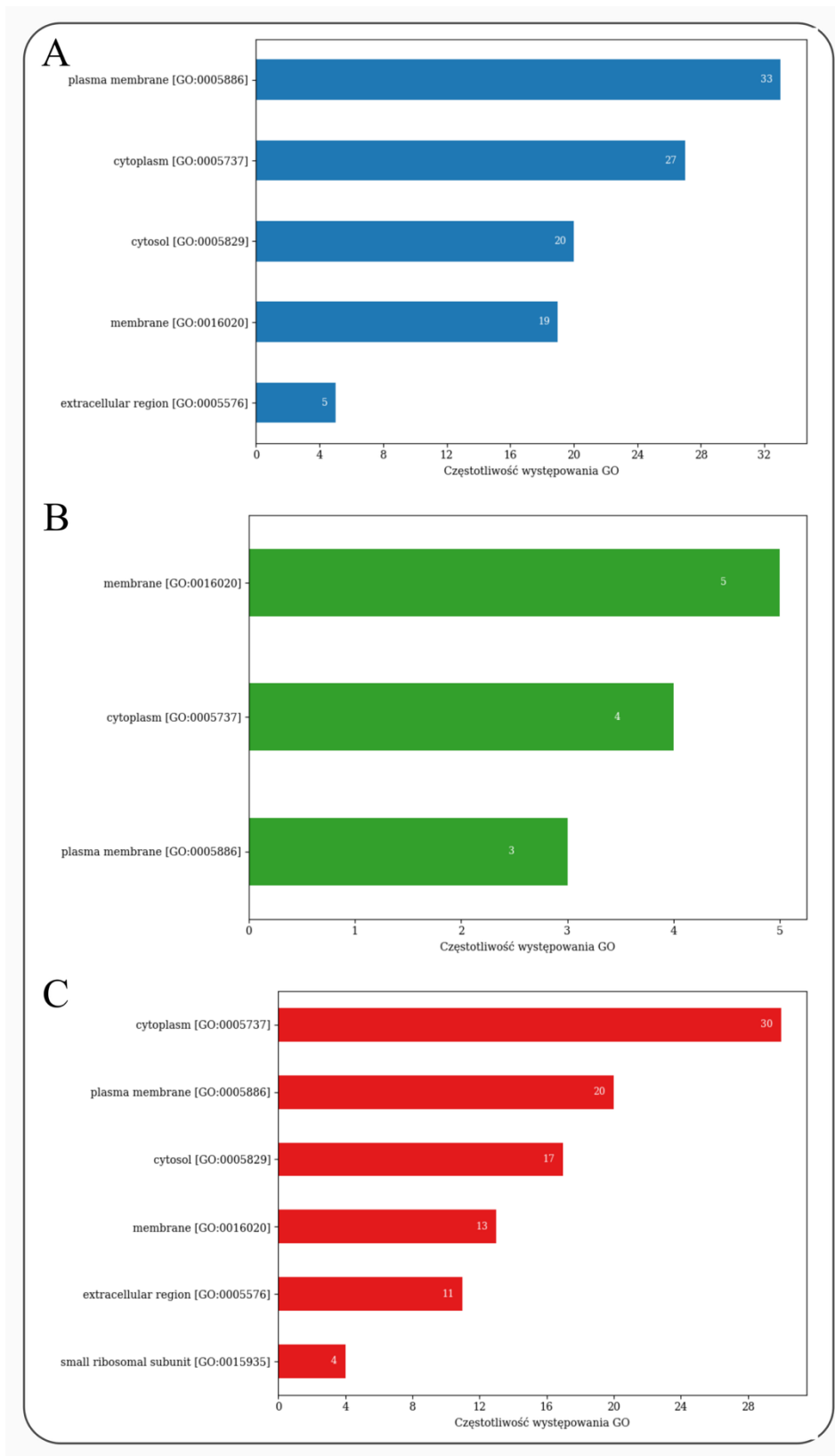
Kolejna analiza została przeprowadzona, aby wychwycić wspólnych funkcji biologicznych genów, które w odpowiedzi na antybiotyk mają ten sam trend w zmianie reaktywności w rejonie miejsca inicjacji translacji oraz zmianie efektywności procesu syntezy białek. W tym celu pobrano listy genów z grup B i C (Rycina 31), które były charakterystyczne w odpowiedzi na dany antybiotyk, oraz te, które łączą oba zbiory. Dla tych zbiorów genów przeprowadzono klasyfikację funkcji molekularnych, komponentów komórkowych oraz procesów biologicznych na podstawie ontologii genów (GO, *ang. Gene Ontology*) (Ryciny 32-35). Tam, gdzie było to możliwe GO wizualizowane było od liczby zliczeń większej od 2.



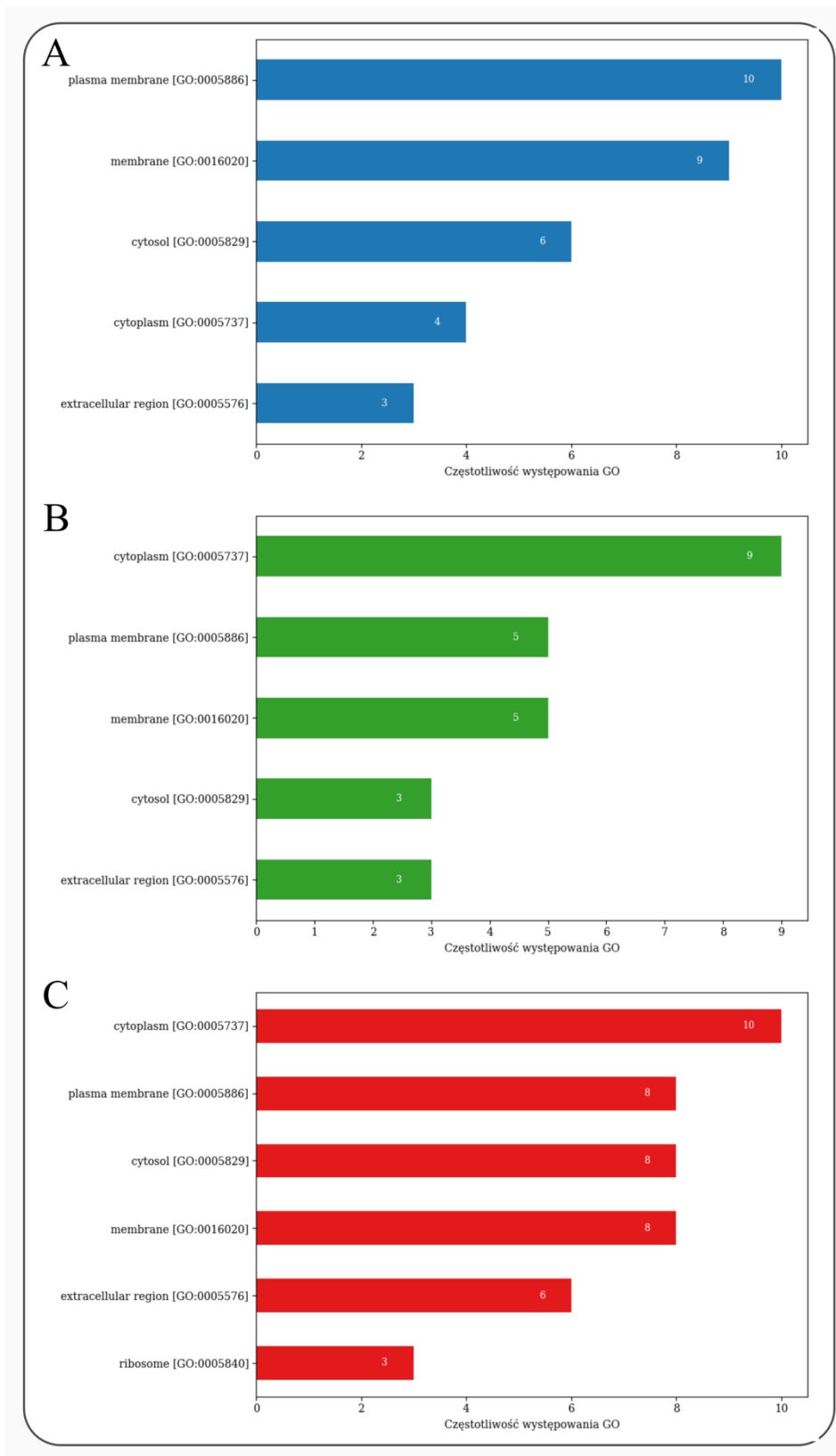
Rycina 32. Wykresy częstotliwości występowania poszczególnych funkcji molekularnych zidentyfikowanych na podstawie GO w grupie genów o pozytywnym trendzie zmian reaktywności efektywności translacji. A. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. C; B. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. W; C. Geny dzielone w analizie obu warunków.



Rycina 33. Wykresy częstotliwości występowania poszczególnych funkcji molekularnych zidentyfikowanych na podstawie GO w grupie genów o negatywnym trendzie zmian reaktywności efektywności translacji. A. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. C; B. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. W; C. Geny dzielone w analizie obu warunków.



Rycina 34. Wykresy częstotliwości występowania poszczególnych komponentów komórkowych zidentyfikowanych na podstawie GO w grupie genów o pozytywnym trendzie zmian reaktywności efektywności translacji. A. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. C; B. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. W; C. Geny dzielone w analizie obu warunków.



Rycina 35. Wykresy częstotliwości występowania poszczególnych komponentów komórkowych zidentyfikowanych na podstawie GO w grupie genów o negatywnym trendzie zmian reaktywności efektywności translacji. A. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. C; B. Geny charakterystyczne dla porównania K vs. W; C. Geny dzielone w analizie obu warunków.

Analiza funkcji molekularnych genów wykazujących wyższą efektywność translacji oraz zwiększoną reaktywność nukleotydów w warunkach kontrolnych (K) w porównaniu z warunkami traktowanymi (C oraz W) ujawniła szereg dominujących kategorii funkcjonalnych (Rycina 32). Zarówno w porównaniu K vs. C, jak i K vs. W, najczęściej reprezentowaną kategorią była aktywność wiązania ATP (ATP binding [GO:0005524]), występująca w 22 przypadkach. Kolejne istotne funkcje obejmowały wiązanie jonów metali (metal ion binding [GO:0046872]), wiązanie DNA (DNA binding [GO:0003677]), aktywność hydrolizy ATP (ATP hydrolysis activity [GO:0016887]) oraz wiązanie jonów cynku (zinc ion binding [GO:0008270]).

W grupie genów wspólnych dla obu porównań (K vs. C oraz K vs. W) zaobserwowano wzbogacenie w funkcje związane z aktywnością energetyczną i regulacją transkrypcji. Widoczne było zwiększenie liczby genów związanych z wiązaniem ATP (24 przypadki), hydrolizą ATP (12 przypadków) oraz funkcjami strukturalnymi rybosomu (structural constituent of ribosome [GO:0003735], 8 przypadków). Dodatkowo, w tej grupie pojawiły się funkcje takie jak aktywność hydrolazowa (hydrolase activity [GO:0016787]), aktywność transporterów ABC (ABC-type oligopeptide transporter activity [GO:0015421]) oraz wiązanie FMN (FMN binding [GO:0010181]), które nie były obecne w zestawieniach indywidualnych.

Zbieżność profili funkcjonalnych pomiędzy porównaniami K vs. C i K vs. W oraz ich rozszerzenie w grupie genów wspólnych sugerują, że geny o wyższej translacyjnej aktywności w warunkach kontrolnych pełnią kluczowe role w procesach energetycznych, regulacyjnych i strukturalnych komórki. Może to wskazywać na ich znaczenie w utrzymaniu homeostazy oraz podstawowych funkcji komórkowych w warunkach niepoddanych działaniu czynników stresowych.

W grupie genów wykazujących wyższą efektywność translacji oraz zwiększoną reaktywność nukleotydów w warunkach traktowanych (C oraz W) względem kontroli (K), zaobserwowano ograniczoną liczbę dominujących funkcji molekularnych (Rycina 33). W porównaniu K vs. C najczęściej występowały funkcje wiązania jonów metali (metal ion binding [GO:0046872], 6 przypadków), wiązania ATP (ATP binding [GO:0005524], 4 przypadki) oraz funkcje strukturalne rybosomu (structural constituent of ribosome [GO:0003735], 4 przypadki). W porównaniu K vs. W dominowały wiązanie jonów magnezu (magnesium ion binding [GO:0000287], 3 przypadki), wiązanie jonów metali (3 przypadki) oraz wiązanie ATP (3 przypadki).

W grupie genów wspólnych dla obu porównań (K vs. C oraz K vs. W) zaobserwowano większe zróżnicowanie funkcji molekularnych. Najczęściej reprezentowane były: wiązanie ATP (8 przypadków), wiązanie jonów metali (5 przypadków), funkcje strukturalne rybosomu (4 przypadki), wiązanie DNA (4 przypadki) oraz wiązanie jonów magnezu (4 przypadki). Dodatkowo pojawiły się funkcje takie jak wiązanie RNA (RNA binding [GO:0003723]) oraz aktywność hydrolizy ATP (ATP hydrolysis activity [GO:0016887]), każda zidentyfikowana w 3 przypadkach.

Obserwowane funkcje molekularne wskazują, że geny aktywowane translacyjnie w warunkach traktowanych mogą pełnić role związane z regulacją aktywności enzymatycznej, wiązaniem nukleotydów oraz strukturą rybosomalną. Ich obecność w obu porównaniach sugeruje potencjalne zaangażowanie w adaptacyjne mechanizmy odpowiedzi komórkowej na warunki stresowe.

W analizie komponentów komórkowych genów charakteryzujących się wyższą efektywnością translacji oraz zwiększoną reaktywnością nukleotydów w miejscu inicjacji translacji w warunkach kontrolnych (K) względem próbek traktowanych (C oraz W), zaobserwowano wyraźne wzbogacenie w struktury związane z błonami komórkowymi oraz cytoplazmą (Rycina 34). W porównaniu K vs. C dominującym komponentem była błona komórkowa (plasma membrane [GO:0005886], 33 przypadki), a następnie cytoplazma (cytoplasm [GO:0005737], 27 przypadków), cytosol (cytosol [GO:0005829], 20 przypadków) oraz ogólna kategoria błonowa (membrane [GO:0016020], 19 przypadków). Obecność regionu zewnątrzkomórkowego (extracellular region [GO:0005576], 5 przypadków) może wskazywać na udział tych genów w procesach komunikacji międzykomórkowej.

W porównaniu K vs. W komponenty były mniej licznie reprezentowane, jednak nadal dominowały struktury błonowe i cytoplazmatyczne: błona (membrane [GO:0016020], 5 przypadków), cytoplazma (4 przypadki) oraz błona komórkowa (3 przypadki).

W grupie genów wspólnych dla obu porównań zaobserwowano konsolidację tych obserwacji. Najczęściej występowały: cytoplazma (30 przypadków), błona komórkowa (20 przypadków), cytosol (17 przypadków) oraz błona (13 przypadków). Dodatkowo pojawił się komponent związany z translacją — mała podjednostka rybosomu (small ribosomal subunit [GO:0015935], 4 przypadki), co może wskazywać na bezpośrednie zaangażowanie tych genów w inicjację procesu translacyjnego.

W grupie genów wykazujących zwiększoną efektywność translacji oraz wyższą reaktywność nukleotydów w miejscu inicjacji translacji w próbach traktowanych (C oraz W) względem warunków kontrolnych (K), dominowały komponenty komórkowe związane z błonami oraz cytoplazmatyczną lokalizacją (Rycina 35). W porównaniu K vs. C najczęściej identyfikowanymi strukturami były: błona komórkowa (plasma membrane [GO:0005886], 33 przypadki), cytoplazma (cytoplasm [GO:0005737], 27 przypadków), cytosol (cytosol [GO:0005829], 20 przypadków) oraz błona (membrane [GO:0016020], 19 przypadków). Obecność regionu zewnątrzkomórkowego (extracellular region [GO:0005576], 5 przypadków) może wskazywać na udział tych genów w procesach sekrecyjnych lub komunikacji międzykomórkowej.

W porównaniu K vs. W komponenty były mniej licznie reprezentowane, jednak nadal dominowały struktury błonowe i cytoplazmatyczne: błona (membrane [GO:0016020], 5 przypadków), cytoplazma (4 przypadki) oraz błona komórkowa (3 przypadki).

W grupie genów wspólnych dla obu porównań zaobserwowano konsolidację tych obserwacji. Najczęściej występowały: cytoplazma (30 przypadków), błona komórkowa (20 przypadków), cytosol (17 przypadków), błona (13 przypadków) oraz region zewnątrzkomórkowy (11 przypadków). Dodatkowo pojawiła się mała podjednostka rybosomu (small ribosomal subunit [GO:0015935], 4 przypadki), co może wskazywać na bezpośrednie zaangażowanie tych genów w inicjację translacji.

Zebrane dane sugerują, że geny aktywowane translacyjnie w warunkach traktowanych oraz kontrolnych lokalizują się głównie w obrębie błon komórkowych i cytoplazmy, co może odzwierciedlać ich rolę w procesach transportu, sygnalizacji oraz organizacji przestrzennej translacji w odpowiedzi na warunki eksperymentalne.

W ramach analizy procesów biologicznych opisanych w GO, przypisanych genom należącym do wyodrębnionych grup, zaobserwowano znaczną liczbę procesów biologicznych powiązanych wyłącznie z pojedynczymi genami. Tego rodzaju jednostkowe przypisania mogą prowadzić do nadinterpretacji wyników oraz zaburzać ogólny obraz funkcjonalnej charakterystyki analizowanych grup. Co więcej, ze względu na dużą liczbę zidentyfikowanych procesów oraz ich zróżnicowaną specyfikę, trudne staje się wyodrębnienie tych, które mają największe znaczenie biologiczne lub są najbardziej reprezentatywne dla danej grupy genów.

5. PODSUMOWANIE

W obliczu narastającego problemu antybiotykooporności, szczególnie w przypadku szczepów *Staphylococcus aureus*, konieczne jest pogłębione zrozumienie mechanizmów molekularnych regulujących ekspresję genów odpowiedzialnych za oporność. Jednym z kluczowych procesów komórkowych, który podlega ścisłej kontroli, jest translacja — etap przekształcania informacji genetycznej zawartej w mRNA w funkcjonalne białka. Ze względu na swoją energochłonność i znaczenie dla przetrwania komórki, translacja jest regulowana zarówno globalnie, jak i na poziomie pojedynczych transkryptów. Ryboprzelączniki jako strukturalne elementy RNA zdolne do wiązania konkretnych metabolitów, odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie translacyjnym. Ich wysoka swoistość, zdolność do szybkiej reakcji oraz obecność w regionach niekodujących mRNA czynią je obiecującymi celami terapeutycznymi, szczególnie w kontekście projektowania biosensorów i leków przeciwdrobnoustrojowych. Zmiany konformacyjne wywołane przez kompleks aptamer–ligand wpływają na dostępność miejsca inicjacji translacji, umożliwiając aktywację lub hamowanie syntezy białek w zależności od warunków środowiskowych.

W celu zbadania związku między konformacyjnymi zmianami w strukturze drugorzędowej RNA a regulacją translacji genów pod wpływem stresu antybiotykowego, wykorzystano dwie komplementarne techniki: do analizy struktury RNA oraz Ribo-seq do oceny aktywności translacyjnej. SHAPE-MaP (*ang. Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension and Mutational Profiling*) umożliwia mapowanie konformacyjnie elastycznych nukleotydów z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu. Dzięki połączeniu chemicznej modyfikacji RNA z sekwencjonowaniem nowej generacji i analizą mutacyjną, metoda ta pozwala na precyzyjne określenie lokalnej dynamiki strukturalnej RNA, identyfikację motywów strukturalnych oraz modelowanie alternatywnych konformacji. Profilowanie rybosomalne (Ribo-seq), stanowi komplementarne podejście umożliwiające analizę translacji *in vivo* z rozdzielczością pojedynczego nukleotydu. Technika ta polega na sekwencjonowaniu fragmentów mRNA chronionych przez rybosomy w trakcie translacji. Po zatrzymaniu rybosomów, niezwiązane z nimi RNA jest degradowane enzymatycznie, pozostawiając krótkie fragmenty (RPFs), które są następnie izolowane, transkrybowane do cDNA i poddawane sekwencjonowaniu. Mapowanie uzyskanych sekwencji względem genomu pozwala na precyzyjne określenie pozycji rybosomów, identyfikację aktywnie tłumaczonych regionów, alternatywnych miejsc inicjacji translacji

oraz analizę efektywności translacji i dynamiki elongacji. Eksperymenty przeprowadzono na szczepie metycyloopornego *Staphylococcus aureus* (MRSA), hodowanym w trzech warunkach: kontrolnym (bez antybiotyków), z dodatkiem wankomycyny oraz z dodatkiem cefoksytyny.

Zastosowanie obu metod — SHAPE-MaP i Ribo-seq — w spójnym układzie eksperymentalnym pozwoliło na zintegrowaną analizę struktury RNA i aktywności translacyjnej w warunkach fizjologicznych oraz pod wpływem subletalnych stężeń antybiotyków. Takie podejście umożliwiło ilościowe określenie wydajności translacji poszczególnych mRNA oraz ocenę dostępności elementów kluczowych dla inicjacji tego procesu. Integracja danych strukturalnych i translatomowych pozwala na wskazanie potencjalnych celów terapeutycznych w leczeniu infekcji bakteryjnych.

Dane sekwencyjne uzyskane w eksperymencie charakteryzowały się wysoką jakością, choć różniły się głębokością pokrycia — szczególnie w przypadku Ribo-seq, gdzie krótsze fragmenty RNA skutkowały niższym odsetkiem odczytów mapujących unikalnie. Mimo to, skuteczna rybodeplecja i oczyszczenie danych pozwoliły na uzyskanie materiału odpowiedniego do dalszych analiz.

Wyniki SHAPE-MaP wykazały, że stres antybiotykowy prowadzi do wyraźnych zmian konformacyjnych w rejonach mRNA związanych z inicjacją translacji, takich jak miejsce wiązania rybosomu (RBS) oraz kodon startowy. Podczas analizy tych zmian, w warunkach traktowanym wankomycyną, zaobserwowano dominację genów o zwiększonej reaktywności strukturalnej względem kontroli. W przypadku cefoksytyny przeważały geny o obniżonej reaktywności, co może wskazywać na różne strategie adaptacyjne bakterii w odpowiedzi na odmienne mechanizmy działania leków.

Analiza danych Ribo-seq nie wykazała istotnych statystycznie zmian w efektywności translacji mRNA w odpowiedzi na stres antybiotykowy. Może to sugerować, że mechanizmy regulacyjne w odpowiedzi na stres antybiotykowy, w tym przypadku zachodzą głównie na poziomie struktury RNA lub transkrypcji, a nie translacji.

Warto również zauważyć, że mimo wyraźnego rozdzielenia próbek w przestrzeni MDS, wskazującego na różnice w globalnym profilu translacyjnym, analiza różnicowa nie ujawniła spójnych sygnałów na poziomie pojedynczych genów. Obserwacje te wskazują, że translacja w warunkach stresu antybiotykowego może być regulowana w sposób bardziej subtelny i lokalny, trudny do uchwycenia przy użyciu standardowych metod analizy różnicowej.

Korelacja pomiędzy zmianami konformacyjnymi RNA a poziomami translacji poszczególnych transkryptów okazała się złożona i niejednoznaczna. Wykresy ćwiartek oraz analiza klasteryzacyjna wskazują, że niektóre grupy genów wykazują zgodne kierunki zmian — np. jednoczesny spadek dostępności strukturalnej i translacji — jednak w skali całego genomu nie zaobserwowano silnej, globalnej korelacji. Najwyższy współczynnik korelacji ($r \approx 0,35$) wystąpił w podgrupie genów o obniżonej reaktywności i translacji, co może wskazywać na bardziej spójny mechanizm regulacyjny w tej frakcji. Ogólnie jednak relacja między strukturą RNA a translacją może być modulowana przez dodatkowe czynniki, którymi mogą być m.in. lokalne motywy strukturalne, obecność regulatorowych sRNA czy interakcje z białkami.

Podczas realizacji założeń rozprawy opracowano również metodę analityczną, która na podstawie danych NGS umożliwia identyfikację zależnych od siebie zmian struktury drugorzędowej RNA oraz poziomów translacji, co może stanowić podstawę do projektowania nowych strategii terapeutycznych. Systemowe podejście do analizy translacji i struktury RNA może przyczynić się do wyłonienia celów terapeutycznych, które pozwolą na opracowanie antybiotyków oddziałujących na wiele szlaków jednocześnie, utrudniając bakteriom rozwój oporności. Rozszerzenie tej metody na inne gatunki bakterii może również wspierać badania nad regulacją ekspresji genów w mniej poznanych mikroorganizmach. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki stanowią punkt wyjścia do pogłębionej analizy roli struktur RNA w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za antybiotykooporność.

6. BIBLIOGRAFIA

Aghdam, E. M., Hejazi, M. S., & Barzegar, A. (2016). Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene*, 592(2), 244-259.

Andersson, M. I., & MacGowan, A. P. (2003). Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(suppl_1), 1-11.

Ariza-Mateos, A., Nuthanakanti, A., & Serganov, A. (2021). Riboswitch mechanisms: new tricks for an old dog. *Biochemistry (Moscow)*, 86(8), 962-975.

Becker, B., & Cooper, M. A. (2013). Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS chemical biology*, 8(1), 105-115.

Bédard, A. S. V., Hien, E. D., & Lafontaine, D. A. (2020). Riboswitch regulation mechanisms: RNA, metabolites and regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1863(3), 194501.

Bezrukov, F., Prados, J., Renzoni, A., & Panasenko, O. O. (2021). MazF toxin causes alterations in *Staphylococcus aureus* transcriptome, translome and proteome that underlie bacterial dormancy. *Nucleic Acids Research*, 49(4), 2085-2101.

Binda, E., Marinelli, F., & Marcone, G. L. (2014). Old and new glycopeptide antibiotics: action and resistance. *Antibiotics*, 3(4), 572-594.

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, 13(1), 42-51.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Brar, G. A., & Weissman, J. S. (2015). Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(11), 651-664.

Breaker, R. R. (2018). Riboswitches and translation control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(11), a032797.

Busan, S., & Weeks, K. M. (2018). Accurate detection of chemical modifications in RNA by mutational profiling (MaP) with ShapeMapper 2. *Rna*, 24(2), 143-148.

Chełkowska-Pauszek, A., Kosiński, J. G., Marciniak, K., Wysocka, M., Bąkowska-Żywicka, K., & Żywicki, M. (2021). The role of RNA secondary structure in regulation of gene expression in bacteria. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 7845.

Chen, Y., McCarthy, D., Ritchie, M., Robinson, M., Smyth, G., & Hall, E. (2020). edgeR: differential analysis of sequence read count data User's Guide. *R Packag*, (June), 1-121.

Choe, D., Szubin, R., Dahesh, S., Cho, S., Nizet, V., Palsson, B., & Cho, B. K. (2018). Genome-scale analysis of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 reveals a tradeoff between pathogenesis and drug resistance. *Scientific reports*, 8(1), 2215.

Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J., & Townsend, S. D. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 10(8), 1231-1241.

Delcher, A. L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., & Salzberg, S. L. (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic acids research*, 27(23), 4636-4641.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.

Elvers, K. T., Wilson, V. J., Hammond, A., Duncan, L., Huntley, A. L., Hay, A. D., & Van Der Werf, E. T. (2020). Antibiotic-induced changes in the human gut microbiota for the most commonly prescribed antibiotics in primary care in the UK: a systematic review. *BMJ open*, 10(9), e035677.

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International journal of applied microbiology and biotechnology research*, 4(2016), 90-101.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, 2(1), 40-61.

FastQC. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Frye, S. A., Beyene, G. T., Namouchi, A., Gomez-Munoz, M., Homberset, H., Kalayou, S., ... & Balasingham, S. V. (2017). The helicase DinG responds to stress due to DNA double strand breaks. *PLoS One*, 12(11), e0187900.

Geissmann, T., Marzi, S., & Romby, P. (2009). The role of mRNA structure in translational control in bacteria. *RNA biology*, 6(2), 153-160.

Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(4), a025387.

Grove, A. (2013). MarR family transcription factors. *Current biology*, 23(4), R142-R143.

Grynberg, M., & Godzik, A. (2004). NERD: a DNA processing-related domain present in the anthrax virulence plasmid, pXO1. *Trends in biochemical sciences*, 29(3), 106-110.

Haddad, M. F., Abdullah, B. A., AlObeidi, H. A., Saadi, A. M., & Haddad, M. F. (2024). Antibiotic classification, mechanisms, and indications: A review. *International Journal of Medical and All Body Health Research*, 5(3), 39-46.

Harris, C. R., Millman, K. J., Van Der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., ... & Oliphant, T. E. (2020). Array programming with NumPy. *nature*, 585(7825), 357-362.

Harrison, C. J., & Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: a review. *Pediatrics in review*, 29(8), 264-273.

He, X., Thornton, J., Carmicle-Davis, S., & McDaniel, L. S. (2006). Tex, a putative transcriptional accessory factor, is involved in pathogen fitness in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial pathogenesis*, 41(6), 199-206.

Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in science & engineering*, 9(03), 90-95.

Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R., & Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *science*, 324(5924), 218-223.

- Ingolia, N. T., Hussmann, J. A., & Weissman, J. S. (2019). Ribosome profiling: global views of translation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *11*(5), a032698.
- Jubeh, B., Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, *25*(12), 2888.
- Kato, F., Yamaguchi, Y., Inouye, K., Matsuo, K., Ishida, Y., & Inouye, M. (2023). A novel gyrase inhibitor from toxin–antitoxin system expressed by *Staphylococcus aureus*. *The FEBS Journal*, *290*(6), 1502-1518.
- Kaźmierczak, U., & Kwaśniak-Owczarek, M. (2019). Profilowanie rybosomów jako innowacyjne narzędzie do badania procesu syntezy białek. *Postępy Biochemii*, *65*(1), 41-51.
- King, H. A., & Gerber, A. P. (2016). Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Briefings in functional genomics*, *15*(1), 22-31.
- Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature reviews microbiology*, *10*(4), 255-265.
- Kramer, O. (2016). Scikit-learn. In *Machine learning for evolution strategies* (pp. 45-53). Cham: Springer International Publishing.
- Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, *31*(4), 10-1128.
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, *4*(1), 1-23.
- Levine, D. P. (2006). Vancomycin: a history. *Clinical infectious diseases*, *42*(Supplement_1), S5-S12.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079.

Lukashin, A. V., & Borodovsky, M. (1998). GeneMark. hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic acids research*, 26(4), 1107-1115.

Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L., & Einsle, O. (2013). The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biological chemistry*, 394(6), 715-727.

Machtel, P., Bąkowska-Żywicka, K., & Żywicki, M. (2016). Emerging applications of riboswitches—from antibacterial targets to molecular tools. *Journal of applied genetics*, 57, 531-541.

Mailler, E., Paillart, J. C., Marquet, R., Smyth, R. P., & Vivet-Boudou, V. (2019). The evolution of RNA structural probing methods: from gels to next-generation sequencing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(2), e1518.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.

McCallum, N., Berger-Bächli, B., & Senn, M. M. (2010). Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2-3), 118-129.

McKinney, W. (2010). Data structures for statistical computing in Python. *scipy*, 445(1), 51-56.

Miller, E. L. (2002). The penicillins: a review and update. *Journal of midwifery & women's health*, 47(6), 426-434.

Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088.

Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., ... & Dekker, D. M. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199-1226.

NORGEN. Total RNA Purification Kit. Product Insert
<https://norgenbiotek.com/sites/default/files/resources/Total-RNA-Purification-Kit-Insert-PI17200-32->

M14.pdf?srsltid=AfmBOop7wLZGOZA16ZhQzdh4kRPyw783MukMJreSOQ0w0sGrly43E42r

Omotajo, D., Tate, T., Cho, H., & Choudhary, M. (2015). Distribution and diversity of ribosome binding sites in prokaryotic genomes. *BMC genomics*, 16(1), 604.

Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical reviews*, 13(2), 259-272.

Palmer, K. L., Kos, V. N., & Gilmore, M. S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current opinion in microbiology*, 13(5), 632-639.

Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *the Journal of machine Learning research*, 12, 2825-2830.

Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841-842.

Retsema, J., & Fu, W. (2001). Macrolides: structures and microbial targets. *International journal of antimicrobial agents*, 18, 3-10.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*, 26(1), 139-140.

Rodnina, M. V. (2018). Translation in prokaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(9), a032664.

Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2014). Vancomycin revisited—60 years later. *Frontiers in public health*, 2, 217.

Salvail, H., & Breaker, R. R. (2023). Riboswitches. *Current Biology*, 33(9), R343-R348.

Schleifer, K. H. (2009). Classification of Bacteria and Archaea: past, present and future. *Systematic and applied microbiology*, 32(8), 533-542.

Shlykov, M. A., Zheng, W. H., Chen, J. S., & Saier Jr, M. H. (2012). Bioinformatic characterization of the 4-Toluene Sulfonate Uptake Permease (TSUP) family of transmembrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1818(3), 703-717.

Simonetti, A., Marzi, S., Jenner, L., Myasnikov, A., Romby, P., Yusupova, G., ... & Yusupov, M. (2009). A structural view of translation initiation in bacteria. *Cellular and molecular life sciences*, 66(3), 423.

Siegfried, N. A., Busan, S., Rice, G. M., Nelson, J. A., & Weeks, K. M. (2014). RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-MaP). *Nature methods*, 11(9), 959-965.

Suzek, B. E., Ermolaeva, M. D., Schreiber, M., & Salzberg, S. L. (2001). A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes. *Bioinformatics*, 17(12), 1123-1130.

Tarazona, S., Furió-Tarí, P., Ferrer, A., & Conesa, A. (2013). NOISeq: Differential Expression in RNA-seq. *Bioconductor*, 2, 22.

Thititanpakorn, K., Aiba, Y., Tan, X. E., Watanabe, S., Kiga, K., Sato'o, Y., ... & Cui, L. (2020). Association of *mprF* mutations with cross-resistance to daptomycin and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Scientific reports*, 10(1), 16107.

Thomas, P. D., Ebert, D., Muruganujan, A., Mushayahama, T., Albou, L. P., & Mi, H. (2022). PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science*, 31(1), 8-22.

Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., ... & Van Mulbregt, P. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods*, 17(3), 261-272.

Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *TRENDS in Genetics*, 20(1), 44-50.

Wang, X. W., Liu, C. X., Chen, L. L., & Zhang, Q. C. (2021). RNA structure probing uncovers RNA structure-dependent biological functions. *Nature chemical biology*, 17(7), 755-766.

Waskom, M. L. (2021). Seaborn: statistical data visualization. *Journal of open source software*, 6(60), 3021.

Wickham H (2023). stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations. R package version 1.5.1, <https://github.com/tidyverse/stringr>, <https://stringr.tidyverse.org>.

Wickham H, Hester J, Bryan J (2024). readr: Read Rectangular Text Data. R package version 2.1.5, <https://github.com/tidyverse/readr>, <https://readr.tidyverse.org>.

Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2025). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4, <https://dplyr.tidyverse.org>.

Wickham H, Vaughan D, Girlich M (2025). tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.3.1, <https://tidyr.tidyverse.org>.

Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2003). Genetic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBiochem*, 4(10), 1024-1032.

Zaru, R., Orchard, S., & UniProt Consortium. (2023). UniProt tools: BLAST, align, peptide search, and ID mapping. *Current protocols*, 3(3), e697.