

Narastająca oporność bakterii na klasyczne antybiotyki stymuluje do podejmowania poszukiwań nowych substancji o działaniu przeciwbakteryjnym o wysokiej skuteczności, małej podatności na rozwój oporności i znikomej toksyczności dla człowieka. Obecnie szczególnie ogromne nadzieje pokłada się w związkach o budowie analogicznej do naturalnych kwasów nukleinowych. Są to tzw. peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). Ich oligomery mają zdolność wiązania się do komplementarnych odcinków nici DNA czy RNA. Dzięki temu mogą blokować ekspresję genów niezbędnych do życia bakterii, prowadząc do zahamowania ich wzrostu bądź śmierci. PNA działają w sposób wysoce specyficzny, zatem wytworzenie przeciw nim oporności byłoby bardzo trudnym zadaniem dla bakterii. Wszystkie te cechy sprawiają, że PNA mogłoby stać się antybiotykiem przyszłości, który walkę z bakteriami wniósłby na wyższy poziom.

Niestety słaba przenikalność PNA do komórek bakteryjnych skutecznie hamuje zastosowanie PNA jako substancji przeciwbakteryjnej. Jak dotąd próbowano łączyć PNA z innymi związkami, jak np. peptydami i udało się do pewnego stopnia poprawić ich biodostępność dla bakterii. Jednak nie jest to poprawa wystarczająca do uzyskania wysokiej skuteczności działania przeciwbakteryjnego. Dlatego też zaproponowaliśmy strategię opartą o witaminę B₁₂, która dołączona do PNA, pełni rolę ich transportera do wnętrza komórek bakteryjnych. Ostatnio wykazaliśmy, że witamina B₁₂ wprowadza peptydowe kwasy nukleinowe do komórek bakterii *E. coli* i *S. typhimurium*. Nie znamy jednak szlaku transportu jaki wykorzystują koniugaty witaminy B₁₂ i PNA. Wydaje się, że najbardziej prawdopodobną drogą ich przenikania do bakterii jest białkowy system transportujący witaminę B₁₂. Istnieją ku temu przesłanki, gdyż w ramach badań wstępnych wykazaliśmy, że jedno z białek tworzących ten system, tzw. białko BtuB jest niezbędne do transportu koniugatów do komórek bakterii.

Głównym celem projektu jest weryfikacja czy pozostałe białka, takie jak: BtuF, BtuC oraz BtuD również uczestniczą w transporcie PNA połączonego z witaminą B₁₂ do komórek bakteryjnych. Ponadto zbadamy jak koniugaty witaminy B₁₂ i PNA oddziałują z tymi białkami na poziomie molekularnym. W ramach projektu przeprowadzimy syntezę odpowiednio zaprojektowanych sekwencji PNA i ich koniugatów z witaminą B₁₂. W celu weryfikacji czy białko BtuF, a także kompleks białkowy BtuCD biorą udział w transporcie koniugatów witaminy B₁₂ i PNA u *E. coli*, użyjemy szczepów pozbawionych tych białek. Ponadto poddamy badane szczepy transformacji, dzięki czemu zyskają one zdolność czerwonej fluorescencji w świetle UV. Tak przygotowane szczepy zostaną umieszczone w środowisku koniugatów witaminy B₁₂ i PNA, którego zadaniem jest blokada ekspresji genu czerwonej fluorescencji, czego objawem będzie spadek czerwonej fluorescencji bakterii. Aby uzyskać taki efekt, PNA musi znaleźć się we wnętrzu komórki bakterii. Zatem mierząc czerwoną fluorescencję bakterii po ekspozycji na koniugaty witaminy B₁₂ i PNA można jednoznacznie stwierdzić czy PNA zostało wprowadzone do komórki bakterii. Porównując wyniki fluorescencji u bakterii zmutowanych i szczepu dzikiego *E. coli* wystawionych na działanie koniugatów witaminy B₁₂ i PNA będzie można wywnioskować czy dane białko, którego zmutowany szczep jest pozbawiony, jest zaangażowane w transport tych substancji do komórki bakteryjnej. Badania eksperymentalne uzupełnimy o badania teoretyczne, w których zbadamy oddziaływania pomiędzy koniugatami witaminy B₁₂ i PNA i białkiem BtuF oraz kompleksem BtuCD na poziomie molekularnym stosując techniki dokowania i pełnoatomowej dynamiki molekularnej.

Poznanie mechanizmu transportu peptydowych kwasów nukleinowych za pomocą witaminy B₁₂ do komórek bakterii pozwoli na głębsze zrozumienie działania białek wspomagających transport witaminy B₁₂ i możliwości ich adaptacji do transportu pochodnych witaminy B₁₂. Może również dostarczyć informacji, które zostaną wykorzystane do zoptymalizowania struktury koniugatów witaminy B₁₂ i PNA, aby zwiększyć wydajność ich transportu, co może przełożyć się na ich większą aktywność biologiczną. Poszerzy to także naszą wiedzę o potencjalnych ścieżkach wprowadzania substancji przeciwbakteryjnych, takich jak PNA, do komórek bakteryjnych. Co więcej, droga transportu witaminy B₁₂ może być rozpoznana jako szlak nieinwazyjnego wprowadzania innego rodzaju substancji do komórek bakteryjnych z udziałem witaminy B₁₂.