

Metabolizm RNA *Helicobacter pylori*: identyfikacja wrażliwych punktów metabolizmu RNA w celu odkrycia nowych leków przeciwdrobnoustrojowych

Jakub Skibiński^{1,2*}, Przemysław Płociński², Yaroslav Lavrynychuk^{1,2}, Magdalena Chmiela²

¹ Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Szkoła Doktorska BioMedChem UŁ i Instytutów PAN w Łodzi (ul. Matejki 21/23 90-237, Łódź)

² Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej (ul. Stefana Banacha 12/16; 90-237, Łódź)

Wstęp

Ponad połowa ludzi na świecie jest zakażona Gram-ujemną bakterią *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). U około 20% z nich rozwija się zapalenie błony śluzowej żołądka, wrzody żołądka lub dwunastnicy, a przewlekłe zakażenie może prowadzić do raka żołądka. Ze względu na rosnącą oporność *H. pylori* na antybiotyki stosowane w zwalczaniu takich zakażeń (metronidazol, amoksycylina, klarytromycyna) istnieje konieczność poszukiwania nowych leków oraz celów molekularnych, których zaburzenie mogłoby zakłócić metabolizm tych bakterii i doprowadzić do ich eradykacji. Zahamowanie procesów degradacji i metabolizmu RNA, może potencjalnie takie efekty spowodować. Do głównych białek degradosomu RNA *H. pylori* należą min. helikaza RNA (RhpA) oraz fosforylaza polinukleotydowa (PNP). Według literatury zahamowanie aktywności PNP może wpływać na oporność patogenów bakteryjnych na antybiotyki i wspomagać ich eliminację.

Materiały i metody

Rekombinowane białka PNP i RhpA *H. pylori* produkowano w systemie ekspresji *E. coli* i oczyszczano za pomocą technik chromatograficznych. Poszukiwanie inhibitorów aktywności białka PNP odbywało się w oparciu o testy hamowania aktywności poliadenylacyjnej tego białka w opracowanym teście fluorymetrycznym z wykorzystaniem 8 tys. związków chemicznych z MedChemExpress. Mutanty *H. pylori* w zakresie PNP lub RhpA konstruowano poprzez przerywanie ciągłości genu kodującego dane białko z wprowadzeniem kasety oporności na kanamycynę. Za pomocą chromatografii żelowej oraz termoforezy mikroskalarnej sprawdzano występowanie oddziaływań pomiędzy białkiem PNP i RhpA.

Wyniki

Zidentyfikowano 402 związki chemiczne, które hamowały aktywność białka PNP przy stężeniu 100 μ M oraz hamowały wzrost *H. pylori*. Skonstruowano dwa żywotne mutanty delecyjne *H. pylori* osobno dla białek PNP i RhpA. Wykluczono interakcje pomiędzy białkami PNP i RhpA. Analiza transkryptomiczna mutantów delecyjnych wykazała znaczące zmiany w profilu transkryptomicznym w przypadku delecji genu *RhpA* oraz ograniczone zmiany transkryptomiczne po delecji genu *PNP*. Mutanty delecyjne cechowały się zmienionym profilem lekowrażliwości względem wybranych antybiotyków (amoksycylina, metronidazol).

Wnioski

Zidentyfikowano związki chemiczne hamujące aktywność PNP, co pozostawało w związku z zahamowaniem wzrostu *H. pylori*. Uzyskane wyniki stanowią obiecującą podstawę do opracowania nowych terapii przeciwko tym chorobotwórczym pałeczkom wskazując na możliwość celowania w metabolizm RNA bakterii. Opracowana strategia stanowi nowe podejście w walce z zakażeniami wywoływanymi przez szczepy *H. pylori* odporne na antybiotyki.