

Agnieszka Markowska-Zagrajek<sup>1,3</sup>, Marcin Równicki<sup>2,3</sup>, Joanna Trylska<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup>Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>3</sup>Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Peptydowe kwasy nukleinowe (PNA) 3. Zalety i wady PNA. 4. Sposoby transportu PNA do komórek bakteryjnych. 5. Inhibicja wzrostu bakterii poprzez wiązanie się z bakteryjnym mRNA. 6. Inhibicja wzrostu bakterii poprzez wiązanie się z bakteryjnym rRNA. 7. Zastosowanie PNA w biotechnologii. 8. Podsumowanie

#### Inhibition of bacterial translation and growth by antisense peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology

**Abstract:** The broad use of antibiotics has resulted in the survival and spread of resistant bacterial strains. Bacteria can effectively acquire resistance when exposed to antibiotics. Therefore, it is crucial to find new antimicrobial drugs to combat antibiotic-resistant pathogens. Antisense technology involving targeting or modifying gene expression in a sequence-dependent manner has been applied to distinguish bacterial species, design antibacterials or in diagnostic applications. Typically, the bacterial target is either DNA or mRNA but there exist examples of bacterial ribosomal RNA targets. Natural oligonucleotides are unstable so in the antisense applications most often their modified versions are used. Synthetic nucleic acid analogues include locked nucleic acids, peptide nucleic acids (PNAs), and phosphorodiamidate morpholino oligomers. We will focus on the applications of PNAs, which are neutral DNA analogues containing a pseudo-peptide backbone instead of a charged phosphate one. PNA oligomers are not degraded by proteases and nucleases. Furthermore, PNAs are not recognized by RNases. PNA oligomers can efficiently hybridize with DNA or RNA strands, and form stable duplexes or triplexes. Here, we review the studies on the development of antisense PNA sequences targeting bacterial mRNAs and rRNAs. In addition, the future prospects on the use of PNA in biotechnology are discussed.

1. Introduction. 2. Peptide nucleic acids (PNAs). 3. Advantages and disadvantages of PNA. 4. Transport of PNA into bacterial cells. 5. Inhibition of bacterial growth by targeting bacterial mRNA. 6. Inhibition of bacterial growth by targeting bacterial rRNA. 7. The use of PNA in biotechnology. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** mRNA, peptydowe kwasy nukleinowe, rRNA, rybosom, technologia antysensowna

**Key words:** antisense technology, mRNA, peptide nucleic acids, ribosome, rRNA

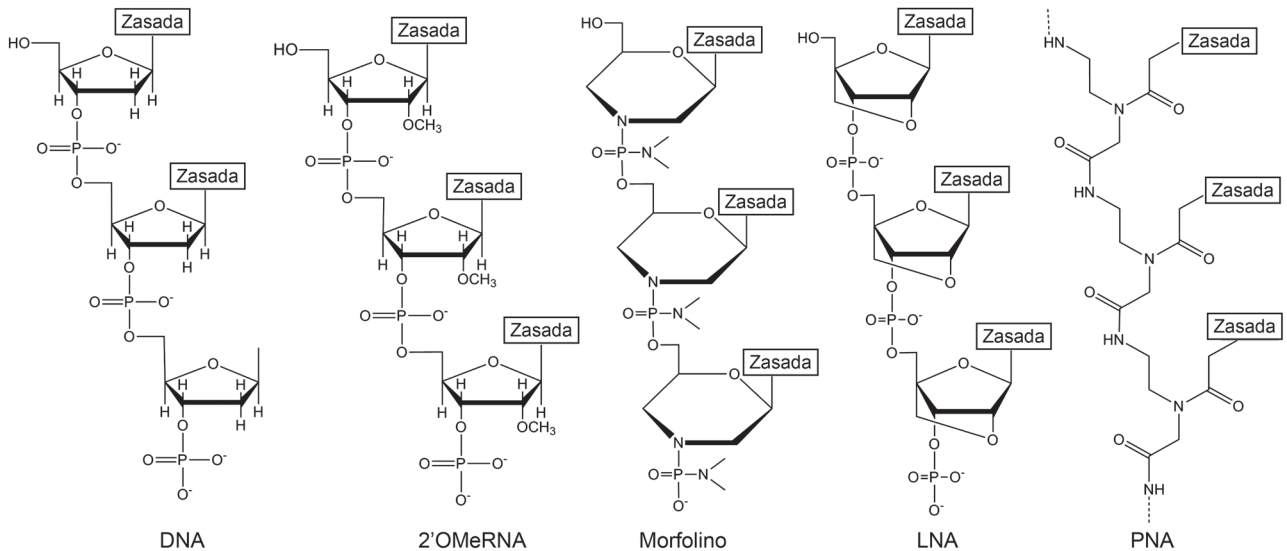
## 1. Wstęp

Stosowanie antybiotyków na szeroką skalę w leczeniu ludzi i hodowli zwierząt, przyczyniło się do rozwoju oporności u bakterii na konwencjonalne antybiotyki [1]. Dlatego ważne jest znalezienie nowych narzędzi, za pomocą których można będzie zwalczać te drobnoustroje. Technologia antysensowna oparta o kontrolę ekspresji genów obecnie stosowana jest w bioinżynierii, w terapiach antynowotworowych oraz do projektowania nowych klas antybiotyków [24]. Tradycyjne metody antysensowne wykorzystują krótkie oligodeoksynukleotydy, które łączą się do specyficznego mRNA na zasadzie parowania zasad Watsona-Cricka [35]. Oligodeoksynukleotydy są jednak szybko degradowane przez nukleazy, więc możliwości użycia ich w technologii antysensownej są ograniczone. Ponieważ naturalne oligodeoksynukleotydy są niestabilne, dopiero wynalezienie ich zmodyfikowanych strukturalnie i chemicznie wersji przyczyniło się do

rozwoju technologii antysensownej. Obecnie używa się syntetycznych analogów kwasów nukleinowych takich jak: (i) RNA zmetylowany w pozycji 2'O – 2'OMeRNA (2'O-methyl RNA), (ii) kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji – LNA (Locked Nucleic Acids), (iii) morfolino – PMO (Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers), czy (iv) peptydowe kwasy nukleinowe – PNA (Peptide Nucleic Acids). Przykładowe zmodyfikowane oligonukleotydy wraz z porównaniem do naturalnego DNA są przedstawione na Rysunku 1.

Komplementarne oddziaływanie krótkich oligonukleotydów z sekwencjami transkryptu mRNA może zaburzać prawidłową funkcję mRNA na dwa sposoby [50]. Pierwszy sposób to indukowanie degradacji utworzonego dupleksu oligonukleotyd-mRNA przez RNazę H. Enzym ten aktywują na przykład RNA, oligonukleotydy zawierające w łańcuchu fosforanowym siarkę oraz, częściowo, LNA. Drugi sposób to steryczne blokowanie mRNA, które po utworzeniu kompleksu z oligonukleotydem nie może poprawnie oddziaływać

\* Autor korespondencyjny: Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Banacha 2c, 02-097 Warszawa; tel. +48 (22) 5543-600; e-mail: joanna@cent.uw.edu.pl



Rys. 1. Porównanie struktur wybranych, syntetycznych analogów kwasów nukleinowych do DNA. Szczegóły w tekście.

z rybosomem. Ten mechanizm sterycznego blokowania jest charakterystyczny dla PNA, 2'OMeRNA oraz PMO [50].

PNA nie jest degradowane przez enzymy takie jak proteazy i nukleazy [7]. Oligomery PNA mogą łączyć się z dwu- lub jednoniciowymi DNA lub RNA, tworząc stabilne duplekisy lub triplekisy [50]. Ze względu na biostabilność i wysokie powinowactwo do DNA, PNA znalazło zastosowanie w badaniach, diagnostyce i jako narzędzie terapeutyczne [60]. Antysensowne sekwencje PNA wycelowane w mRNA kluczowych dla bakterii genów prowadzą do zahamowania wzrostu komórek bakteryjnych [20, 33]. Okazało się, że oprócz mRNA, również rybosomowe RNA (rRNA) może być celem dla antysensownych oligonukleotydów [19, 25, 58, 68], które dzięki temu mogą skutecznie blokować wzrost komórek bakteryjnych.

Klasyczną i najprostszą metodą w poszukiwaniu nowych substancji antybakteryjnych jest sprawdzenie ich zdolności do hamowania wzrostu komórek bakteryjnych poprzez wyznaczenie tzw. minimalnego stężenia hamującego (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC). W poszukiwaniu oligomerów oddziałujących z mRNA stosuje się metody takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Wyciszanie mRNA poprzez antysensowne oligonukleotydy powoduje zaburzenia translacji oraz degradację mRNA. Można więc mierzyć poziom mRNA, aby ocenić skuteczność działania antysensownych oligonukleotydów [16].

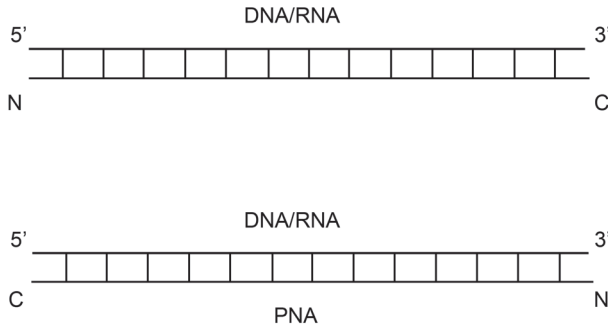
W celu sprawdzenia skuteczności działania sekwencji antysensownej w konkretnym szczepie bakterii można najpierw zastosować test oparty o ekspresję genów reporterowych [16]. W testowaniu aktywności inhibitorów hamujących syntezę białek ważnym kro-

kiem jest sprawdzenie potencjału oligomeru w ekstrakcie komórkowym (tzw. *cell-free transcription/translation system*). Ekstrakt komórkowy zawiera całą maszynę niezbędną do syntezy białek, jednak pozbawiony jest ściany komórkowej. Jako wskaźnika efektywności używa się wartości stężenia oligomeru, które hamuje produkcję białka reporterowego w 50% (wartość  $IC_{50}$ ). Zaletą stosowania tej metody jest możliwość sprawdzenia, czy inhibitor, którego chcemy użyć, celuje specyficznym w proces translacji. Ponieważ metoda ta jest bardziej czuła niż MIC (ze względu na wspomniany brak ściany komórkowej) stosuje się mniejsze stężenia inhibitora. Ostatecznie jednak należy przetestować inhibitor na komórkach bakteryjnych i wyznaczyć wartość MIC, aby upewnić się, że badany związek jest w stanie wnikać do komórek [58]. Kilka inhibitorów translacji zostało zidentyfikowanych przy użyciu tej metody [3].

Przedmiotem poniższej pracy przeglądowej jest przedstawienie zagadnień dotyczących inhibicji wzrostu bakterii poprzez wiązanie się antysensownych sekwencji PNA z mRNA i rRNA bakterii.

## 2. Peptydowe kwasy nukleinowe

Peptydowe kwasy nukleinowe zostały po raz pierwszy zsyntetyzowane w 1991 roku przez P. E. Nielsen a w laboratorium O. Bucharda [41]. PNA jest syntetycznym analogiem DNA, w którym zasady nukleinowe połączone zostały łańcuchem polipeptydowym zbudowanym z podjednostek *N*-(2-aminoetylo) glicyny za pomocą wiązań peptydowych (Rys. 1) [26, 42, 53]. Zastąpienie łańcucha fosforanowo-cukrowego szkieletem podobnym do peptydowego spowodowało całkowitą odporność PNA na nukleazy, czyli

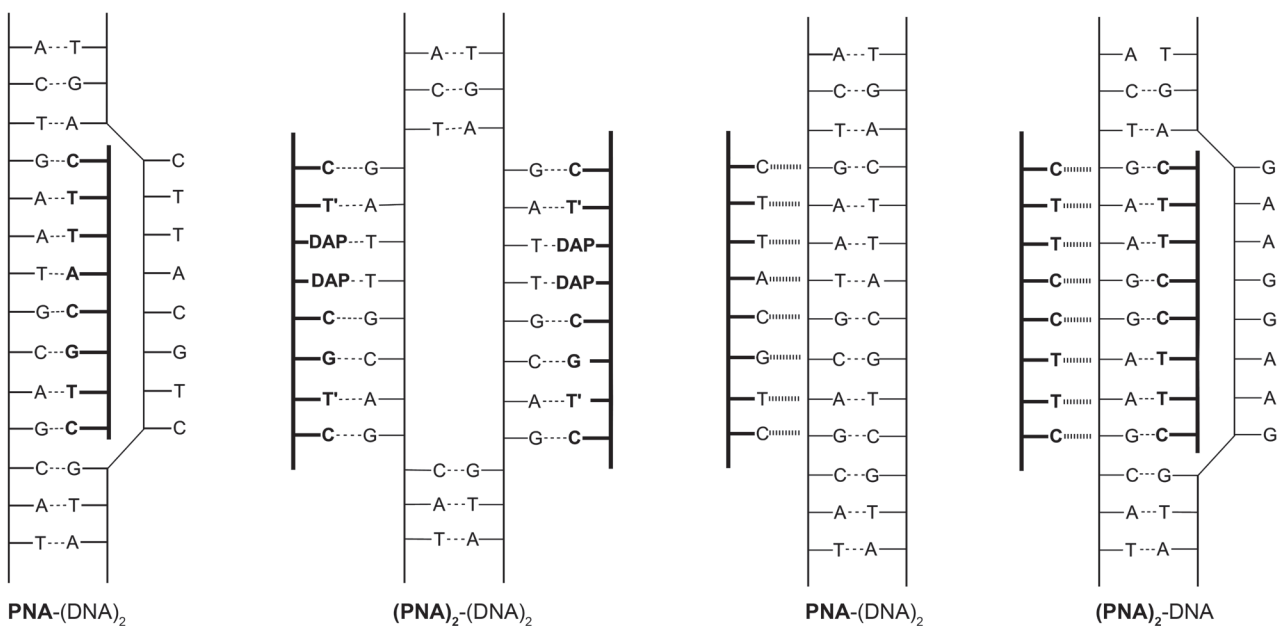


Rys. 2. Sposoby tworzenia dupleksów PNA z DNA lub RNA

enzymy degradujące naturalne kwasy nukleinowe [41, 53, 60]. Ponadto, dzięki usunięciu ujemnie naładowanych reszt kwasu fosforowego i zastąpieniu ich grupami amidowymi, cząsteczki PNA, w odróżnieniu od naturalnych kwasów nukleinowych, mają ładunek obojętny [51]. Dzięki temu PNA może tworzyć wysoce stabilne kompleksy z DNA, RNA oraz PNA [2, 25, 58], np. temperatura topnienia duplesu PNA-PNA o długości 15 merów wynosi 69,5°C, natomiast analogiczny kompleks DNA-DNA posiada temperaturę topnienia 56,1°C [12].

Tworzenie dupleksów z PNA może zachodzić w dwojaki sposób: (i) równolegle, kiedy koniec N cząsteczki PNA skierowany jest w kierunku końca 5' DNA lub RNA oraz (ii) antyrównolegle, gdy końcowa grupa -NH<sub>2</sub> skierowana jest do końca 3' nici DNA lub RNA (Rys. 2). Uprzywilejowaną jest orientacja antyrównoległa, ponieważ wiązanie antyrównoległej cząsteczki PNA do DNA lub RNA zachodzi zdecydowanie szybciej i z większym powinowactwem niż w przypadku orientacji równoległej [62]. PNA może tworzyć także

trójniciowe kompleksy przyłączając się do podwójnej helisy DNA. Przykładowe struktury z udziałem PNA przedstawiono na Rysunku 3. Mechanizm tworzenia kompleksu typu (PNA)<sub>2</sub>-DNA opiera się na lokalnej dysocjacji wiązań między komplementarnymi niciami duplesu DNA, a następnie przyłączeniu komplementarnego odcinka PNA do jednej lub dwóch nici DNA [10, 26, 40, 42]. Tworzenie takich struktur odbywa się dzięki wiązaniom wodorowym typu Watsona-Cricka oraz Hoogstena [10]. Takie tripleksy tworzone są przede wszystkim przez oligomery homopirymidynowe lub zawierające znaczną przewagę pirymidyn nad purynami. W przypadku kompleksu typu (PNA)<sub>2</sub>-DNA oligomer PNA charakteryzuje się wysoką zawartością cytozyny w swojej strukturze [47, 66]. Stabilność tych kompleksów rośnie proporcjonalnie do długości łańcucha oligomeru [51]. Z kolei oligomery PNA zawierające w większości zasady purynowe tworzą z dwuniciowym DNA duplesy połączone wiązaniami wodorowymi typu Watsona-Cricka. Możliwe jest również utworzenie struktury kwadrupleksu (PNA)<sub>2</sub>-(DNA)<sub>2</sub>, z zastosowaniem modyfikowanego dwuniciowego PNA komplementarnego do DNA. Zmiana w PNA dotyczy adeniny i tyminy, na miejsce których wprowadzane są, odpowiednio, diaminopuryna oraz tiouracyl. Taki zmieniony dwuniciowy PNA ulega sterycznej destabilizacji i dzięki temu może utworzyć z dwuniciowym DNA omawianą strukturę [36]. Ponadto, oligomery PNA można połączyć giętkim neutralnym łącznikiem; produkt takiego połączenia nazywany jest bis-PNA. Oligomery bis-PNA mogą łączyć się z kwasami nukleinowymi i tworzyć z nimi formy tripleksowe [10].



Rys. 3. Możliwe sposoby wiązania PNA do duplesu DNA. Linia pogrubiona – PNA; linia cienka – DNA, linia przerywana – wiązania Watsona-Cricka, ||||| – wiązania Hoogstena, DAP – diaminopuryna, T' – tiouracyl

### 3. Zalety i wady oligomerów PNA

Zaletą PNA jest jego odporność na działanie nukleaz, proteaz i peptydaz, oraz stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury, dzięki czemu może się on znacznie dłużej utrzymywać w środowisku wewnątrzkomórkowym niż naturalne kwasy nukleinowe [10, 30]. Brak ujemnie naładowanych reszt kwasu fosforowego w cząsteczce PNA powoduje brak odpychania elektrostatycznego podczas tworzenia kompleksów z DNA, RNA czy PNA. Monomery PNA syntetyzują się przy użyciu niedrogich substratów [13]. Oligomery PNA można uzyskać poprzez syntezę na nośniku stałym [67]. PNA nie jest cząsteczką „idealną” i istnieją pewne ograniczenia w jej stosowaniu. Ze względu na hydrofobowy charakter PNA charakteryzuje mniejsza rozpuszczalność w roztworach niż DNA czy RNA [9]. Często do jednego z końców oligomeru PNA przyłącza się dodatkowo naładowany aminokwas, na przykład lizynę, co poprawia rozpuszczalność PNA [41]. Istotne trudności sprawia także transport PNA do komórek, zwłaszcza bakteryjnych, w których barierą jest ich ściana komórkowa. Ponadto, PNA nie rozróżnia oligomerów DNA od RNA, a także może wiązać się z nimi w dwóch kierunkach [12, 31] (Rys. 2) co ogranicza jego zdolność do specyficznego rozpoznawania sekwencji.

### 4. Sposoby transportu PNA do komórek bakteryjnych

Oslony komórkowe bakterii stanowią skuteczną barierę dla obcych molekuł, w tym PNA [20]. W przypadku bakterii Gram-ujemnych główną przeszkodę stanowi lipopolisacharyd (LPS) – składnik zewnętrznej błony komórkowej. Aby ułatwić wprowadzanie PNA do wnętrza komórek bakteryjnych, stosuje się krótkie peptydy transportujące np. (KFF)<sub>3</sub>K, do których przyłączony jest oligomer PNA [17]. Peptyd ten został odkryty przez V a r a i P o r r o [61], którzy udowodnili skuteczność jego działania, pomimo iż zaproponowany przez nich mechanizm molekularny zwiększenia przepuszczalności ściany komórkowej i poprawy pobierania PNA dzięki zastosowaniu (KFF)<sub>3</sub>K budzi kontrowersje [17]. Peptyd ten był oryginalnie przeznaczony do poprawy wprowadzania PNA do komórek *Escherichia coli*, a wydajność transfekcji przy jego użyciu różni się w zależności od badanego gatunku bakterii [48, 57]. Jednakże najnowsze badania pokazują, że również Gram-dodatnie bakterie *Bacillus subtilis* i *Corynebacterium efficiens* wykazują zwiększoną podatność na PNA-(KFF)<sub>3</sub>K [23]. Peptydy penetrujące ścianę komórkową powinny być dodatkowo naładowanymi, amfipatycznymi cząsteczkami, ponieważ wówczas charakteryzują się najwyższą wydajnością [37, 39]. Innymi związkami, które mogą pomóc rozwiązać problem dostarczania

oligonukleotydów do komórek mogą być na przykład liposomy, polimery kationowe lub dendrymery [6, 14], ale skuteczność tych metod nie została dobrze zweryfikowana w przypadku komórek bakteryjnych.

### 5. Inhibicja wzrostu bakterii poprzez wiązanie się z bakteryjnym mRNA

Liczne publikacje donoszą, że antysensowne sekwencje PNA wycelowane w mRNA powstające w wyniku transkrypcji genów niezbędnych do życia komórki (*essential genes*) prowadzą do zahamowania wzrostu komórek bakteryjnych. Sekwencje PNA, których używano w opisanych poniżej badaniach, miały długość 10–16 nukleotydów.

Jednym z takich genów jest gen kodujący enzym β-laktamazę. Przetestowano 90 antysensownych sekwencji celujących w cały transkrypt mRNA genu β-laktamazy [8]. Jest to gen *E. coli*, warunkujący oporność na antybiotyki β-laktamowe. Najbardziej wrażliwym na działania PNA był region startowy w mRNA tego genu, zawierający sekwencję Shine-Dalgarno. Sekwencja Shine-Dalgarno występuje w mRNA komórek prokariotycznych i jest miejscem wiązania mRNA do rybosomu. Jest komplementarna do sekwencji na końcu 3' 16S rybosomowego RNA w małej podjednostce rybosomu [52]. Sekwencje, które celowały poza region startowy były w dużej mierze nieskuteczne [8]. Antysensowne sekwencje PNA wycelowane poza kodon startowy w mRNA kodującym białko nie wpłynęły na zmiany poziomu ekspresji genów lub wzrost komórek [8, 29].

W innych badaniach zaobserwowano zahamowanie wzrostu wieloopornej bakterii *Klebsiella pneumoniae* przy użyciu antysensownej sekwencji PNA wycelowanej w dwa geny: *gyrA* (kodujący podjednostkę A gyrazy DNA) i *ompA* (kodujący białko A błony zewnętrznej) [32]. Bakteryjne białko gyraza jest dobrze poznanym celem dla antybiotyków. Brak syntezy podjednostki A gyrazy DNA, potrzebnej w procesie replikacji DNA, powoduje zahamowanie wzrostu komórek bakteryjnych. Zarejestrowano kompletne zahamowanie wzrostu bakterii i ekspresji transkryptu genu *gyrA* w przypadku, gdy PNA było połączone z peptydem transportującym (KFF)<sub>3</sub>K. Gdy PNA celujące w transkrypt genu *gyrA* nie było połączone z peptydem transportującym, nie obserwowano zmiany poziomu ekspresji tego genu ani wpływu PNA na wzrost komórek. PNA nieodpowiadające dokładnie komplementarnej sekwencji w mRNA (różniące się w dwóch pozycjach nukleotydowych) nie hamowało wzrostu komórek bakteryjnych. PNA wycelowane w mRNA genu *gyrA* doprowadziło do degradacji mRNA, a następnie zablokowania procesu translacji.



PNA wycelowane w transkrypt genu *ompA* również zahamowało wzrost bakterii *K. pneumoniae* oraz ekspresję genu *ompA*. Także w tym wypadku niezbędne było przyłączenie do antysensownej sekwencji PNA peptydu transportującego, a peptyd kontrolny (z niekomplementarnymi zasadami) okazał się być nieskuteczny [32].

W badaniach nad *Staphylococcus aureus* przy użyciu antysensownych PNA obniżono poziom ekspresji genu *gyrA* i genu *fmbB*, zaangażowanego w biosyntezę ściany komórkowej [39]. PNA było wycelowane również w mRNA genu *hmrB*, ortologa genu *acpP* (46% identycznych aminokwasów) u *E. coli*, który bierze udział w procesie syntezy kwasów tłuszczowych [39]. Wzrost komórek *E. coli* został wcześniej z powodzeniem zablokowany przez PNA wycelowane w mRNA genu *acpP* [17]. Kontrolne sekwencje PNA z dwoma podmienionymi nukleotydami nie miały wpływu na wzrost bakterii, ani zmiany w ekspresji genów. Obserwacja ta wskazuje, że PNA wycelowane w mRNA kluczowych dla bakterii genów hamuje ekspresję tych genów i wzrost komórek bakteryjnych w sposób specyficzny dla danej sekwencji [23, 39].

Antysensowne sekwencje PNA znalazły również swoje zastosowanie w zahamowaniu aktywności transportera CmeA, komponentu błonowego transportera CmeABC, który pełni istotną funkcję w determinowaniu oporności na antybiotyki u *Campylobacter jejuni*. PNA wiązało się z mRNA genu *cmeA*, blokując proces translacji, a tym samym syntezę białka CmeA. Skutkiem tego było zmniejszenie oporności *C. jejuni* na antybiotyki takie jak erytromycyna i cyprofloksacyna [28].

Inne badania [49] wykazały, że PNA wycelowane w geny kodujące enzymy zaangażowane w biosyntezę kwasów nukleinowych, kwasów tłuszczowych, składników ściany komórkowej oraz w przebieg procesu translacji mogą hamować wzrost komórek bakterii *Brucella suis*. PNA, które zahamowały wzrost *B. suis* były wycelowane w następujące geny: *kdtA* (kodujący transferazę zaangażowaną w syntezę lipidu A), *tsf* (kodujący czynnik elongacji translacji EF-Ts), *polA* (kodujący polimerazę DNA I) oraz *rpoB* (kodujący podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA). Ponieważ *B. suis* infekuje wnętrza komórek fagocytarnych, w tym makrofagów, ważne było sprawdzenie, czy PNA będzie hamować także wzrost *B. suis* zlokalizowanej wewnątrzkomórkowo. Określono zdolność do hamowania wzrostu *B. suis* w mysich makrofagach przez PNA i nie odnotowano cytotoksycznego wpływu PNA na eukariotyczną linię komórkową. To badanie wskazuje na potencjalną użyteczność antysensownych sekwencji PNA jako nowych środków terapeutycznych przeciwko wewnątrzkomórkowej bakterii patogennej *B. suis*.

Przy użyciu PNA udało się również znacznie obniżyć poziom ekspresji genu *gyrA* *Streptococcus pyoge-*

*nes*, co pociągnęło za sobą zablokowanie wzrostu komórek [44]. Antysensowna sekwencja wycelowana w mRNA genu *gyrA* była połączona ze standardowo stosowanym peptydem transportującym (KKF)<sub>3</sub>K lub, zastosowanym po raz pierwszy w tej roli, peptydem Tat z wirusa HIV-1 (*trans-activating transcriptional activator*). Wykazano, że sekwencja połączona z peptydem HIV-1 Tat znacznie efektywniej blokuje wzrost komórek bakteryjnych. Sprawdzono również czy antysensowna sekwencja PNA wycelowana w mRNA genu *gyrA*, w użyciu razem z konwencjonalnymi antybiotykami, doprowadzi do wzmocnienia działania obu komponentów. Zaobserwowano zjawisko synergii pomiędzy antysensowną sekwencją PNA a lewofloksacyną i nowobiocyną (antybiotykami które łączą się z gyrazą DNA), oraz spektynomycyną (antybiotyk, który łączy się z podjednostką 30S rybosomu) [44]. Takie kombinowane terapie mogą się przyczynić do wzmocnienia efektu działania komponentów antybakteryjnych. Mogą być również przydatne w wypadku, gdy dana bakteria jest oporna na jeden z czynników.

Wzrost bakterii patogennej *Pseudomonas aeruginosa* również został zahamowany z użyciem PNA. Celem w tym przypadku był mRNA genu *ftsZ*, zaangażowanego w podziały komórkowe, oraz genu *acpP*. PNA był połączony z peptydem o sekwencji H-(R-Ahx-R)<sub>4</sub>-Ahx- $\beta$ ala lub H-(R-Ahx)<sub>6</sub>- $\beta$ ala (Ahx, kwas 6-aminohexanowy, 6-aminohexanoic acid;  $\beta$ ala,  $\beta$ -alanina), gdyż okazało się, że peptyd (KFF)<sub>3</sub>K nie jest wydajny w wypadku tej Gram-ujemnej bakterii. Antysensowne sekwencje PNA połączone z peptydem zahamowały wzrost trzech szczepów bakterii *P. aeruginosa* (w tym dwóch wysoce wirulentnych izolatów klinicznych) [15].

PNA okazało się być również skuteczne w badaniach *in vivo*. PNA wycelowane we wspomniany wcześniej gen *acpP* bakterii *E. coli* zahamowało wzrost komórek bakteryjnych. Zaobserwowano wzrost przeżywalności myszy zakażonych bakteriami, a następnie potraktowanych koniugatem PNA i peptydu (KFF)<sub>3</sub>K, w stosunku do zwierząt nieleczonych [55].

Przedstawione prace wskazują, że celowanie antysensownymi sekwencjami PNA w mRNA bakterii może się okazać w przyszłości skutecznym narzędziem do walki z bakteriami, jednak pod warunkiem znalezienia bardziej efektywnych transporterów oligomerów PNA do komórek bakterii.

## 6. Inhibicja wzrostu bakterii poprzez wiązanie się z rRNA

Oprócz mRNA, również rRNA może być atrakcyjnym celem dla antysensownych oligonukleotydów, skutecznie hamujących proces bakteryjnej translacji. Rybosomowe RNA stanowi 2/3 masy rybosomów

– kompleksów makromolekularnych, w których zachodzi synteza białek w oparciu o informację zapisaną na nici mRNA [34]. Rybosom bakteryjny składa się z dwóch podjednostek: dużej (50S) i małej (30S) [59]. Podjednostka 30S u *E. coli* składa się z 21 białek i jednego łańcucha RNA (16S RNA, około 1500 nukleotydów). Podjednostka 50S zbudowana jest z ponad 30 białek i dwóch łańcuchów RNA (5S RNA – około 120 nukleotydów i 23S RNA – około 2900 nukleotydów) [59]. Wiele klasycznych antybiotyków hamuje wzrost bakterii poprzez przyłączenie się do rybosomu, a tym samym zatrzymuje proces syntezy białek, niezbędnych do życia bakterii [46]. Również niektóre kluczowe sekwencje rRNA zostały przetestowane jako cele działania oligomerów PNA.

Badania wykazują, że oligomery PNA wycelowane w funkcjonalne miejsce w 23S rRNA dużej podjednostki rybosomu bakteryjnego hamują proces translacji zarówno w systemie pozakomórkowym, jak i w układzie *in vivo* [18]. W doświadczeniu tym użyto sekwencji PNA wycelowanych w miejsce funkcyjne peptydylotransferazowe rybosomu (*peptidyl transferase center*) oraz w pętlę  $\alpha$ -sarcyny ( *$\alpha$ -sarcin loop*) znajdujących się w 23S rRNA. Sekwencje PNA tworzyły z 23S rRNA zarówno dupleksy jak i kompleksy trójniciowe. Bis-PNA tworzący formy tripleksowe z rRNA zahamował wzrost komórek bakteryjnych szczepu AS19 *E. coli*, w 10% pożywce LB (*Lysogeny Broth*), tzn. 10% zawartości składników odżywczych w stosunku do stosowanej standardowej pożywki. Bis-PNA tworzy tripleksy na zasadzie pokazanej na Rysunku 3 (PNA<sub>2</sub>/DNA). W systemie *cell-free* proces translacji zablokowano przy użyciu bis-PNA na podobnym poziomie jak w przypadku zastosowania tetracykliny – antybiotyku hamującego wzrost bakterii poprzez przyłączanie się do rybosomu. Natomiast oligomer PNA tworzący dupleks z rRNA nie hamował wzrostu bakterii. Następnie połączono sekwencję PNA wycelowaną w pętlę  $\alpha$ -sarcynową 23S rRNA z peptydem transportującym (KFF)<sub>3</sub>K i zaobserwowano zahamowanie wzrostu komórek szczepu *E. coli* K12 w pożywce o pełnej zawartości składników odżywczych [17].

Zaprojektowano również PNA wycelowane w region Shine-Dalgarno 16S RNA (fragment 1532–1541, numeracja 16S RNA jak u *E. coli*) połączony z peptydem (KFF)<sub>3</sub>K, który skutecznie zablokował proces translacji w ekstrakcie komórkowym z wyznaczoną wartością IC<sub>50</sub> = 0,6  $\mu$ M. Zahamował on także wzrost komórek *E. coli* K12 z wartością MIC = 10  $\mu$ M [23].

Inna grupa badawcza zaprojektowała sekwencję bis-PNA połączoną z peptydem transportującym (KFF)<sub>3</sub>K, wycelowaną w centrum GTPazowe rybosomu (*GTPase-associated centre*) 23S rRNA. Testowano zarówno PNA tworzące formy tripleksowe, jak i dupleksowe. Bis-PNA wycelowany w region nukleotydu G1138 zablokował

proces translacji na poziomie podobnym do tetracykliny. PNA zahamowało również wzrost komórek *E. coli* DH5 $\alpha$  w 10% pożywce LB [68]. Wartość MIC dla PNA wyniosła 10  $\mu$ M, a dla tetracykliny 4  $\mu$ M.

Ze względu na skomplikowaną architekturę rRNA, aby zaprojektować oligonukleotyd, który będzie skutecznie celował w rRNA bakterii, pożądana jest znajomość drugorzędowej i trzeciorzędowej struktury rybosomu. Pozwala to określić dostępność i możliwość „rozerwania” fragmentu rRNA, w który ma być wycelowany oligonukleotyd. Struktura drugorzędowa rRNA jest dobrze poznana u bakterii *E. coli* [43], która z tego powodu jest świetnym modelem do tego typu badań. Ponadto rRNA jest konserwowane ewolucyjnie [5, 65], co oznacza, że niektóre sekwencje rRNA są niezmiennie u niemal wszystkich gatunków bakterii [4, 21]. Rybosomowa RNA jest więc obiecującym celem dla nowych antybiotyków, jednak poszukiwanie nowych miejsc w rRNA nie jest prostym zadaniem, gdyż wymaga zastosowania syntetycznej wiedzy z dziedzin takich jak biologia, bioinformatyka i mikrobiologia. Stawia jednak przed badaczami nowe wyzwania, ponieważ do tej pory zostało zbadanych niewiele miejsc w bakteryjnym rybosomie możliwych do inhibicji poprzez oligonukleotydy [58].

## 7. Zastosowanie PNA w biologii molekularnej

Badania z użyciem technologii antysensownej z wykorzystaniem PNA skupione są głównie na jego potencjalnym zastosowaniu klinicznym. Oprócz stosowania PNA jako inhibitora translacji poprzez jego komplementarne przyłączanie się do mRNA i rRNA, możliwe jest również jego wykorzystanie do hamowania replikacji przez wiązanie się z DNA. Ponadto, PNA może być wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej np. do wykrywania obecności *Mycobacterium tuberculosis* za pomocą hybrydyzacji mRNA ze znakowanym fluorescencyjnie PNA, a także jako narzędzie w biologii molekularnej [24, 54]. Poniżej przedstawiono najważniejsze przykłady zastosowań PNA w biologii molekularnej.

*Hybrydyzacja PNA jako alternatywa dla metody Southerna.* Hybrydyzacja typu Southern to metoda używana do identyfikacji poszukiwanych sekwencji DNA, spośród mieszaniny fragmentów po trawieniu enzymami restrykcyjnymi lub po reakcji PCR z użyciem mało specyficznych starterów. DNA po trawieniu frakcjonuje się w żelu agarozowym, fragmenty zostają rozdzielone proporcjonalnie do ich długości i uszeregowane według wielkości. Hybrydyzacja oligomerów PNA do komplementarnych sekwencji DNA jest niezależna od siły jonowej, ze względu na neutralny ładunek PNA. Zatem oligomery PNA hybrydują

z komplementarnymi oligomerami DNA w warunkach, w których hybrydyzacja DNA-DNA jest niemożliwa, to znaczy przy niskiej sile jonowej [45]. Ponadto, ponieważ rdzeń PNA jest obojętny, ruchliwość elektroforetyczna oligomerów PNA będzie zależeć od ich wielkości. Na ogół będą migrować znacznie wolniej niż DNA w polu elektrycznym. Aby możliwa była identyfikacja zhybrydowanych PNA stosuje się oligomery PNA znakowane fluoroscencyjnie [12]. Wykrywanie związanej sondy PNA jest możliwe bezpośrednio przez detekcję fluorescencyjną w elektroforezie kapilarnej lub przeniesienie dupleksów DNA/PNA na membranę i detekcję za pomocą chemiluminescencji. Technika ta eliminuje żmudne i czasochłonne etapy hybrydyzacji Southern, w tym konieczność kilkukrotnego przepłukania membrany w celu usunięcia niespecyficznie związanej sondy DNA [45].

**Określanie wielkości telomerów.** Standardowa metoda określania długości telomerów wymaga analizy typu *Southern blot* genomowego DNA i określa zakres długości telomerów wszystkich obecnych chromosomów. Nowoczesne podejście wykorzystuje oligonukleotydy znakowane fluorescencyjnie i monitorowanie hybrydyzacji *in situ* dla powtórzeń telomerowych. Jednak znacznie lepsze wyniki ilościowe można uzyskać stosując znakowane fluorescencyjnie PNA, o czym po raz pierwszy donieśli L a n s d o r p i wsp. [33]. Dzięki tej metodzie możliwe jest dokładne oszacowanie długości telomerów, gdyż hybrydyzacja *in situ* znakowanym PNA jest szybsza i wymaga niższych stężeń sondy PNA w porównaniu do sondy DNA. Niski poziom fotowysbielenia oraz bardzo dobry stosunek sygnału do szumu pozwalają na ilościowe oznaczenie powtórzeń sekwencji telomerowych na pojedynczym chromosomie.

**PNA jako sonda do czujnika biologicznego kwasu nukleinowego.** PNA może być wykorzystywany w badaniach diagnostycznych dyskryminacji polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (*Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) w ludzkim DNA dzięki wykorzystaniu spektroskopii mas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight*). Za pomocą MALDI-TOF można szybko i dokładnie wykrywać sondy PNA zhybrydowane do analizowanego DNA. Zapewnia to proste, szybkie, dokładne i specyficzne wykrywanie SNP w amplifikowanym DNA [11]. Wykrywanie wielu mutacji punktowych za pomocą specyficznych dla alleli masowo znakowanych sond PNA jest także możliwe za pomocą bezpośredniej analizy MALDI-TOF-MS [22]. PNA jako sonda kwasów nukleinowych znajduje również zastosowanie w technice BIAcore oraz w badaniu zmian masy za pomocą mikrowagi kwarcowej [27, 64].

Ponadto PNA znalazło zastosowanie w biologii molekularnej i biotechnologii m.in. do wzmacniania sygnału w reakcjach PCR, do wykonywania (w połączeniu z endonukleazami) niespecyficznego cięcia genomowych (*PNA-assisted Rare Cleavage*, PARC), a także w wyszukiwaniu mutacji genetycznych za pomocą elektroforezy kapilarnej [5, 38, 63].

## 8. Podsumowanie

Mimo obiecujących wyników badań, zastosowanie peptydowego kwasu nukleinowego jako leku przeciwnowotworowego, przeciwbakteryjnego czy przeciwwirusowego musi poczekać na rozwój efektywnych i bezpiecznych metod jego dostarczenia do komórek. Z drugiej strony zastosowanie PNA jako cząsteczki detekcyjnej znalazło już zastosowanie w chemii i biotechnologii [19, 56]. Aby uzyskać lepsze własności fizykochemiczne tego analogu kwasu nukleinowego szuka się nowych modyfikacji szkieletu i zasad [60].

Oligomery PNA ze względu na ich specyficzne oddziaływanie z DNA oraz RNA, a także wysoką stabilność chemiczną i biologiczną znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach biologii. Jednym z nich jest opisana w tym artykule technologia antysensowna w oddziaływaniu oligomerów PNA z mRNA i rRNA bakterii.

## Podziękowania

Autorzy dziękują za wsparcie z Narodowego Centrum Nauki (DEC-2012/05/B/NZ1/00035). Agnieszka Markowska-Zagrajek jest współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Szczególne podziękowania kierujemy do magistra Roberta Laska za cenne wskazówki i wsparcie merytoryczne.



KAPITAŁ LUDZKI  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



MINISTERSTWO  
INFRASTRUKTURY  
I ROZWOJU



UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY

## Piśmiennictwo

- Andersson D.I., Hughes D.: Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 260–271 (2010)
- Armitage B.: The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization. *Drug Discov. Today*, **8**, 222–228 (2003)
- Brandl L. i wsp.: Novel tetrapeptide inhibitors of bacterial protein synthesis produced by a *Streptomyces* sp. *Biochemistry*, **45**, 3692–3702 (2006)
- Cannone J.J. i wsp.: The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, **3**, 1–31 (2002)
- Carlsson C., Jonsson M., Norden B., Dulay M., Zare R., Noolandi J., Nielsen P., Tsui L., Zielenski J.: Screening for genetic mutations. *Nature*, **380**, 207 (1996)
- Choi S.K. i wsp.: Dendrimer-based multivalent vancomycin nanoplateform for targeting the drug-resistant bacterial surface. *ACS Nano*, **7**, 214–228 (2013)



7. Demidov V.V., Potaman V.N., Frank-Kamenetskii M.D., Egholm M., Buchard O., Sönnichsen S.H., Nielsen P.E.: Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1310–1313 (1994)
8. Dryselius R., Aswasti S.K., Rajarao G.K., Nielsen P.E., Good L.: The translation start codon region is sensitive to antisense PNA inhibition in *Escherichia coli*. *Oligonucleotides*, **13**, 427–433 (2003)
9. Egholm M., Buchardt O., Nielsen P.E.: Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1895–1897 (1992)
10. Egholm M., Christensen L., Dueholm, K.L., Buchardt O., Coull J., Nielsen P.E.: Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing bis-PNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3–8 (1995)
11. Egholm M.: Spectrometry senses more than a small difference. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1346 (1997)
12. Egholm, M. i wsp.: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, **365**, 566–568 (1993)
13. Falkiewicz B., Wiśniowski W., Kołodziejczyk A.S., Wiśniowski K.: Synthesis of new Chiral Peptide Nucleic Acid (PNA) Monomers. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **20**, 1393–1397 (2001).
14. Gao X., Kim K.-S., Liu D.: Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *AAPS J.* **9**, 92–104 (2007)
15. Ghosal A., Nielsen P.E.: Potent antibacterial antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 323–334 (2012)
16. Goh S., Stach J., Good L.: Antisense Effects of PNAs in Bacteria. In: ed. Peptide Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology; 2014: vol. 1050. 223–236
17. Good L., Awasthi S.K., Dryselius R., Larsson O., Nielsen P.E.: Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates. *Nat. Biotechnol.* **19**, 360–364 (2001)
18. Good L., Nielsen P.E.: Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2073–2076 (1998)
19. Good L., Nielsen P.E.: Antisense inhibition of gene expression in bacteria by PNA targeted to mRNA. *Nat. Biotechnol.* **16**, 355–358 (1998)
20. Good L., Sandberg R., Larsson O., Nielsen P.E., Wahlestedt C.: Antisense PNA effects in *Escherichia coli* are limited by the outer-membrane LPS layer. *Microbiology*, **146**, 2665–2670 (2000)
21. Górska, A.: Inhibition of bacterial translation by Peptide Nucleic Acid oligomers targeting the ribosomal RNA, Uniwersytet Warszawski; 2013
22. Griffin T., Tang W., Smith L.: Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1368–1372 (1997)
23. Hatamoto M., Nakai K., Ohashi A., Imachi H.: Sequence-specific bacterial growth inhibition by peptide nucleic acid targeted to the mRNA binding site of 16S rRNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 1161–1168 (2009)
24. Hatamoto M., Ohashi A., Imachi H.: Peptide nucleic acids (PNAs) antisense effect to bacterial growth and their application potentiality in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 397–402 (2010)
25. Hatcher E., Balaeff A., Keinan S., Venkatramani R., Berañtan D.N.: PNA versus DNA: effects of structural fluctuations on electronic structure and hole-transport mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11752–11761 (2008)
26. Janson C.G., Durring M.J.: The Many Faces of PNA. In: ed. Peptide Nucleic Acids, Morpholinos and Related Antisense Biomolecules. Kluwer Academic/ Plenum Publisher; 2006: 3–17
27. Jensen K.K., Orum H., Nielsen P.E., Nordén B.: Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry*, **36**, 5072–5077 (1997)
28. Jeon B., Zhang Q.: Sensitization of *Campylobacter jejuni* to fluoroquinolone and macrolide antibiotics by antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux transporter. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 946–948 (2009)
29. Knudsen H., Nielsen P.E.: Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res.* **24**, 494–500 (1996)
30. Kosaganov Y.N., Stetsenko D.A., Lubyako E.N., Kvitko N.P., Lazurkin Y.S., Nielsen P.E.: Effect of Temperature and Ionic Strength on the Dissociation Kinetics and Lifetime. **1743**, 11742–11747 (2000)
31. Kumar V. a, Ganesh K.N.: Conformationally constrained PNA analogues: structural evolution toward DNA/RNA binding selectivity. *Acc. Chem. Res.* **38**, 404–412 (2005)
32. Kurupati P., Tan K.S.W., Kumarasinghe G., Poh C.L.: Inhibition of gene expression and growth by antisense peptide nucleic acids in a multiresistant beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 805–811 (2007)
33. Lansdorp P.M., Verwoerd N.P., van de Rijke F.M., Dragowska V., Little M.T., Dirks R.W.; Raap aK., Tanke H.J.: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 685–91 (1996)
34. Laursen B.S.; Sørensen H.P., Kusk K.; Sperling-petersen H.U., Mortensen K.K.: Initiation of Protein Synthesis in Bacteria Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. **69**, 101–123 (2005)
35. Lee L.K., Roth C.M.: Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 505–511 (2003)
36. Lohse J., Dahl O., Nielsen P.E.: Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11804–11808 (1999)
37. Mellbye B.L., Puckett S.E., Tilley L.D., Iversen P.L., Geller B.L.: Variations in amino acid composition of antisense peptide-phosphorodiamidate morpholino oligomer affect potency against *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 525–530 (2009)
38. Misra H.S., Pandey P.K., Modak M.J., Vinayak R., Pandey V. N.: Polyamide nucleic acid-DNA chimera lacking the phosphate backbone are novel primers for polymerase reaction catalyzed by DNA polymerases. *Biochemistry*, **37**, 1917–1925 (1998)
39. Nekhotiaeva N., Awasthi S.K., Nielsen P.E., Good L.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* gene expression and growth using antisense peptide nucleic acids. *Mol. Ther.* **10**, 652–659 (2004)
40. Nielsen P.E., Christensen, L.: Strand Displacement Binding of a Duplex-Forming Homopurine PNA to a Homopyrimidine Duplex DNA Target. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2287–2288 (1996)
41. Nielsen P.E., Egholm M., Berg R.H., Buchardt O.: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**, 1497–1500 (1991)
42. Nielsen P.E.: An Introduction to PNA. In: ed. Peptide Nucleic Acids. Protocols and Applications. Horizon Bioscience; 2004: 1–36
43. Noller H.F., Woese C.R.: Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, **212**, 403–411 (1981)
44. Patenge N., Pappesch R., Krawack F., Walda C., Mraheil M.A., Jacob A., Hain T., Kreikemeyer B.: Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2**, e132 (2013)
45. Perry-O’Keefe H., Yao X.W., Coull J.M., Fuchs M., Egholm M.: Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14670–14675 (1996)



46. Poehlsgaard J., Douthwaite S.: The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 870–881 (2005)
47. Praseuth D., Grigoriev M., Guieysse A.-L., Pritchard L.L., Harel-Bellan A., Nielsen P.E., Hélène C.: Peptide nucleic acids directed to the promoter of the alpha-chain of the interleukin-2 receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1309**, 226–238 (1996)
48. Rajarao G.K., Nekhotiaeva N., Good L.: Peptide-mediated delivery of green fluorescent protein into yeasts and bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 267–272 (2002)
49. Rajasekaran P., Alexander J.C., Seleem M.N., Jain N., Sriranganathan N., Wattam A.R., Setubal J.C., Boyle S.M.: Peptide nucleic acids inhibit growth of *Brucella suis* in pure culture and in infected murine macrophages. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **41**, 358–362 (2013)
50. Rasmussen L.C.V., Sperling-Petersen H.U., Mortensen K.K.: Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microb. Cell Fact.* **6**, 1–26 (2007)
51. Ray A., Nordén B.: Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.* **14**, 1041–1060 (2000)
52. Shine J., Dalgarno L.: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: Complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1342–1346 (1974)
53. Slaitas A.: Development of a new PNA analogue as a potential antisense drug and tool for life-science studies, Karolinska University Press; 2004
54. Stender H., Lund K., Petersen K.H., Rasmussen O.F., Hongmanee P., Miörner H., Godtfredsen S.E.: Fluorescence In situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2760–2765 (1999)
55. Tan X., Actor J.K., Chen Y.: Peptide Nucleic Acid Antisense Oligomer as a Therapeutic Strategy against Bacterial Infection : Proof of Principle Using Mouse Intraperitoneal Infection Peptide Nucleic Acid Antisense Oligomer as a Therapeutic Strategy against Bacterial Infection: Proof. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3203–3207 (2005)
56. Taylor R.W., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Lightowlers R.N.: Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication *in vitro* by peptide nucleic acids. *Nat. Genet.* **15**, 212–215 (1997)
57. Tilley L.D., Hine O.S., Kellogg J., Hassinger J.N., Weller D.D., Iversen P.L., Geller B.L.: Gene-specific effects of antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer-peptide conjugates on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium in pure culture and in tissue culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2789–2796 (2006)
58. Trylska J., Thoduka S.G., Dąbrowska Z.: Using Sequence-Specific Oligonucleotides To Inhibit Bacterial rRNA. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1101–1109 (2013)
59. Trylska J.: Budowa przestrzenna i działanie rybosomu bakteryjnego. Nagroda Nobla z chemii 2009. *Kosmos*, **1–2**, 9–16 (2010)
60. Uhlmann E., Peyman A., Breipohl G., Will D.W.: PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 2796–2823 (1998)
61. Vaara M., Porro M.: Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1801–1805 (1996)
62. Venkatesan N., Kim B.H.: Peptide conjugates of oligonucleotides: synthesis and applications. *Chem. Rev.* **106**, 3712–3761 (2006)
63. Veselkov A G., Demidov V.V, Nielson P.E., Frank-Kamenetskii M.D.: A new class of genome rare cutters. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2483–2487 (1996)
64. Wang J., Nielsen P.E., Jiang M., Cai X., Fernandes J.R., Grant D.H., Ozsoz M., Beglieter A., Mowat M.: Mismatch-sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance. *Anal. Chem.* **69**, 5200–5202 (1997)
65. Wang Y., Qian P.-Y.: Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*, **4**, 1–9 (2009)
66. Wittung P., Nielsen P., Nordén B.: Extended DNA-recognition repertoire of peptide nucleic acid (PNA): PNA-dsDNA triplex formed with cytosine-rich homopyrimidine PNA. *Biochemistry*, **36**, 7973–7979 (1997)
67. Wojciechowska M., Alenowicz M., Parfinowicz B., Dobkowski M., Ruczyński J., Mucha P., Rekowski P.: PNA – Peptydowe kwasy nukleinowe. Synteza, właściwości i inne zastosowanie. In: ed. Na pograniczu chemii i biologii. 2011: 193–206
68. Xue-Wen H., Jie P., Xian-Yuan A., Hong-Xiang Z.: Inhibition of bacterial translation and growth by peptide nucleic acids targeted to domain II of 23S rRNA. *J. Pept. Sci.* **13**, 220–226 (2007)