

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Biologie



Oliver Leštach

Bakteriocíny produkované gramnegatívnymi baktériami so zameraním na mikrocíny - ich
mechanizmus účinku

Bacteriocins produced by gram-negative bacteria with a focus on microcins - their mechanism of
action

Bakalárska práca

Školiteľ: RNDr. Tereza Dolejšová, Ph.D.

Praha, 2024

Pod'akovanie

Ďakujem mojej školitelke RNDr. Tereze Dolejšovej, Ph.D. za pomoc pri písaní bakalárskej práce, za mnohé rady a čas ktorý venovala našim konzultáciám a za rýchlu spätnú väzbu na moje otázky. Za podporu počas celého bakalárskeho štúdia ďakujem všetkým mojim blízkym.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 25.4.2023

Oliver Leštach

Abstrakt

Bakteriocíny sú ribozomálne syntetizované antimikróbne peptidy a proteíny produkované baktériami. Jednou z podskupín bakteriocínov gramnegatívnych baktérií sú mikrocíny. Jedná sa o antimikróbne peptidy s veľkosťou menšou ako 10 kDa, produkované baktériami z čeľade *Enterobacteriaceae*. Mikrocíny tvoria veľmi variabilnú skupinu bakteriocínov, a to nielen z pohľadu mechanizmu účinku, ale aj ďalších charakteristík predstavených v tejto práci. Medzi tieto charakteristiky patria genetické determinanty mikrocinov, ich posttranslačné modifikácie, transport a spôsob imunity produkujúcej bunky. V porovnaní s inými skupinami bakteriocínov sa jedná o menej preskúmané peptidy. Pribúdajú však práce, ktoré poukazujú na ich potenciálne využitie v medicíne. Táto bakalárska práca zahŕňa aktuálne poznatky o štruktúre a mechanizme účinku najlepšie preskúmaných mikrocinov (B17, J25, C7 a E492), ktoré sa všetky vzájomne veľmi líšia. Poznatky o fungovaní mikrocinov prezentované v tejto práci sú podkladom pre ďalší výskum zaoberajúci sa ich praktickým využitím.

Kľúčové slová: bakteriocíny, mikrocíny, antimikróbne peptidy, posttranslačná modifikácia, *Enterobacteriaceae*

Abstract

Bacteriocins are ribosomally synthesised antimicrobial peptides and proteins produced by bacteria. One of the groups of bacteriocins are microcins. Microcins are antimicrobial peptides with size under 10 kDa, produced by bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. Microcins form a heterogenous group of bacteriocins, not only in terms of mechanism of action but also other characteristics presented in this work. These characteristics include genetic determinants of microcins, posttranslational modifications, transport and also how immunity of the producing cell is ensured. Compared to other bacteriocins, microcins are less researched. However, there is a growing number of articles pointing to their potential use in medicine. This bachelor thesis includes current knowledge about the structure and mechanism of action of most researched microcins (B17, J25, C7 and E492), which are all very different from each other. The knowledge about microcins presented in this work is the basis for further research concerning their practical use.

Key words: bacteriocins, microcins, antimicrobial peptides, posttranslational modification, *Enterobacteriaceae*

Zoznam skratiek

ABC	ATP binding cassette
AMP	adenozínmonofosfát
ATP	adenozíntrifosfát
DHBS ₃	N(2,3- dihydroxybenzoyl)-L-serín
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	elongačný komplex
kDa	kilodalton
Man-PTS	manózo-fosfotransferázový systém
mcc	mikrocín
NBD	nukleotid väzobná doména
NTP	nukleozidtrifosfát
PTLB	bakteriocín podobný chvostu bakteriofága
PTM	posttranslačná modifikácia
RiPP	ribozomálne syntetizovaný a posttranslačne modifikovaný peptid
RNA	ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymeráza
TMD	transmembranová doména
tRNA	transferová RNA

Obsah

Úvod.....	1
1 Bakteriocíny	2
1.1 Bakteriocíny produkované grampozitívnymi baktériami.....	2
1.2 Bakteriocíny produkované gramnegatívnymi baktériami	4
2 Mikrocíny.....	6
2.1 Klasifikácia	6
2.2 Genetické determinanty	7
2.3 Štruktúrna pestrosť mikrocínov a úloha post-translačných modifikácií	8
2.3.1 Mikrocín B17	8
2.3.2 Mikrocín J25	9
2.3.3 Mikrocín C7	10
2.3.4 Mikrocín E492	11
2.4 Mechanizmus účinku	12
2.4.1 Mikrocín B17	12
2.4.2 Mikrocín J25	15
2.4.3 Mikrocín C7	17
2.4.4 Mikrocín E492	18
2.5 Transport mikrocínov.....	20
2.5.1 Export z produkujúcej bunky	20
2.5.2 Import do cieľovej bunky.....	21
2.6 Imunita a rezistencia proti mikrocínom	22
Záver	23
Zoznam použitej literatúry:.....	24

Úvod

Podľa Waksmana, (1947) je antibiotikum chemická látka produkovaná mikroorganizmami, ktorá ničí iné mikroorganizmy alebo inhibuje ich rast. Pod túto definíciu spadajú klasické antibiotiká, organické molekuly syntetizované v komplexných enzýmových dráhach. Rovnako táto definícia platí aj pre ribozomálne syntetizované antimikróbne oligopeptidy a polypeptidy (*Hansen, 1993). K definícii od Waksmana možno ešte dodať, že producentom antibiotických látok nemusia byť iba mikroorganizmy. K januáru 2024 je v databáze antimikróbných peptidov (<https://aps.unmc.edu/>) evidovaných 250 rastlinných a 2463 živočíšnych antimikróbných peptidov (Wang et al., 2016). Ich funkcia v mnohobunčných organizmoch je predovšetkým ochrana pred baktériami, v menšej miere aj pred vírusmi, hubami, parazitmi a dokonca aj pred rakovinnými bunkami (*Huan et al., 2020). Antimikróbne peptidy a proteíny produkované baktériami a cieleňé proti baktériam sa nazývajú bakteriocíny (Jacob et al., 1953). Jednou z podskupín bakteriocínov sú posttranslečne modifikované peptidy s veľkosťou menšou ako 10 kDa, produkované gram-negatívnymi enterobaktériami. Práve na základe malej molekulovej veľkosti boli v roku 1976 kategorizované do jedinej skupiny a nazvané mikrocíny (Asensio et al., 1976).

Táto bakalárska práca je rozdelená do dvoch častí. Úlohou prvej časti je predstaviť bakteriocíny, a tým zaradiť mikrocíny do kontextu antimikróbných proteínov produkovaných baktériami. Druhá časť je zložená z kapitol, ktoré poskytujú prehľad o genetickom pozadí mikrocínov, o ich syntéze, transporte a o imunitě a rezistencii proti mikrocínom. Najväčšia pozornosť v rámci druhej kapitoly je venovaná podkapitole o mechanizme účinku, teda o tom, akým spôsobom mikrocíny interagujú s cieľovými bunčnými štruktúrami. V tejto práci sú mikrocíny diskutované predovšetkým na úrovni jednej bakteriálnej bunky. Netreba však zabúdať, že jedným z typických prostredí s vysokým zastúpením mikrocín produkujúcich kmeňov je tráviaca sústava cicavcov s veľkou hustotou bakteriálnych buniek (*Cole et al., 2022). Mikrocíny sa podieľajú na modulácii takto druhovo bohatého prostredia (Ma et al., 2023), čím tvarujú mikrobiom hostiteľského eukaryotického organizmu (Shang et al., 2021). Mikrocíny môžu eukaryotický organizmus ovplyvňovať aj priamo. Varas et al., (2020) ukázali, že mikrocín E492 má silné protinádorové účinky proti ľudským kolorektálnym nádorovým bunkám. Týmto odstavcom som chcel načrtnúť rozsah, v ktorom mikrocíny modulujú okolité prostredie a ukázať jeden zo smerov, ktorým sa výzkum mikrocínov ubera. Znalosti o syntéze, mechanizme účinku, transporte a rezistencii jednotlivých mikrocínov sú kľúčové pre ďalší výzkum zaoberajúci sa ich praktickým využitím.

1 Bakteriocíny

Prvým popísaným bakteriocínom bol v roku 1925 kolicín V (neskôr premenovaný na mccV) produkovaný baktériou *Escherichia coli* (Gratia, 1925). Termín bakteriocín bol prvýkrát použitý až o 28 rokov neskôr a definovaný ako proteín kolicínoveho typu s vnútrodrohovou aktivitou danou prítomnosťou špecifických adsorbčných receptorov na cieľovej bunke (Jacob et al., 1953). Neskôr k tejto definícii pribudli ďalšie charakteristiky, a to že genetické determinanty bakteriocínu sú lokalizované na plazmide (DeWitt & Helinski, 1965) a ich syntéza je pre produkujúcu bunku letálna (*Tagg et al., 1976). S postupným objavom ďalších bakteriocínov však bolo jasné, že nie všetky spĺňajú pôvodnú definíciu. Niektoré bakteriocíny gram-pozitívnych baktérií nevykazujú špecifickú adsorbciu (Gagliano & Hinsdill, 1970; Upreti & Hinsdill, 1975), niektoré bakteriocíny sú kódované chromozomálne (Joerger & Klaenhammer, 1986) a niektoré bakteriocíny sú exportované špecifickými exportnými dráhami a nevyžadujú lýzu produkujúcej bunky (Havarstein et al., 1995). Pre potreby klasifikácie môžeme bakteriocíny rozdeliť podľa typu produkujúcej bunky na bakteriocíny grampozitívnych baktérií a bakteriocíny gramnegatívnych baktérií (Tab.1 a Tab.2).

1.1 Bakteriocíny produkované grampozitívnymi baktériami

Klasifikácia bakteriocínov grampozitívnych baktérií je založená predovšetkým na rozdielnej molekulovej hmotnosti, miere post-translačných modifikácií, sekvencii aminokyselín ale aj na základe mechanizmu účinku. Podľa Acedo et al., (2018) sú rozoznávané tri hlavné triedy, zobrazené v Tabuľke 1.

Trieda I je tvorená bakteriocínmi s výraznou posttranslačnou modifikáciou a veľkosťou do 5 kDa. Pôvodne sem patrili iba lantibiotiká, dnes sú v triede I zaradené mnohé ďalšie peptidy. Každá podtrieda triedy I si nesie svoju špecifickú posttranslačnú modifikáciu, stručne charakterizovanú v Tabuľke 1. V prípade lantibiotík sú to nezvyčajné thioéterové a dehydratované aminokyseliny, predovšetkým lantionin, metyl-lantionin, dehydroalanín a dehydrobutyrin (*Islam et al., 2012). Prvým charakterizovaným bakteriocínom z tejto skupiny bol Nisin, produkovaný baktériou *Streptococcus lactis* (Mattick & Hirsch, 1944). Nisin sa viaže na molekulu lipidu II, čím bráni syntéze peptidoglykanu a zároveň tvorí póry v plazmatickej membráne (Wiedemann et al., 2001). Jedným z týchto dvoch mechanizmov fungujú aj ostatné lantibiotiká (*Islam et al., 2012). Ako receptor môžu okrem lipidu II slúžiť aj iné molekuly. Napríklad cinnamycín selektívne interaguje s fosfatidyletanolamínovou polárnou hlavičkou membránových lipidov (Vestergaard et al., 2019).

Tabuľka 1 – Klasifikácia bakteriocínov grampozitívnych baktérií. V stĺpci s názvom Charakteristika je vlastnosť podtriedy, ktorou sa odlišuje od ostatných podtried. V triede I chceme zdôrazniť pestrosť posttranslačných modifikácií, a to preto, že aj mikrocíny nesú niektoré modifikácie. MccJ25 je lasso peptid a mccB17 obsahuje azolové heterocykly. Tabuľka bola vytvorená podľa prehľadového článku Acedo et al., (2018).

Trieda	Podtrieda	Charakteristika	Príklad
I < 5kDa Modifikované	Lantibiotiká	thioéterové a dehydratované aminokyseliny	Nisin
	Lipolantíny	MK na N-konci + avionin*	Microvionin
	Tiopeptidy	6-článkový dusíkatý heterocyklus	Tiostrepton
	Glykocíny	Glykosylovaný Cys, Ser, Thr	Glykocin F
	Lineárne azol-obsahujúce peptidy	Oxazolové a thiazolové heterocykly	Goadsporin
	Lasso peptidy	Intramolekulárny kruh s prevlečeným C-koncom	Lariatín A
	Saktibiotiká	Väzba medzi atómom síry cysteínu a α -uhlíkom vedľajšej aminokyseliny	Subtilosín A
II < 10 kDa Nemodifikované	Peptidy podobné pediocínu	YGNG motív, S-S mostík	Sakacín P
	Dvojpeptidové bakteriocíny	Zložené z dvoch proteínov	Plantaricín EF
	Bakteriocíny bez leader sekvencie	Neobsahujú leader sekvenciu	Enterocín 7A
	Iné lineárne peptidy	Neobsahujú YGNG motív	Enterocín B
III >10 kDa	Bakteriolyzíny	Hydrolyza peptidoglykanu	Lysostafín
	Nelytické bakteriocíny	Inhibícia príjmu glukózy	Dysgalakticín

MK – masťná kyselina. *Avionin je triaminodikarboxylová kyselina.

Druhú triedu bakteriocínov produkovaných grampozitívnymi baktériami tvoria peptidy, ktoré neobsahujú posttranslačné modifikácie a ich veľkosť nepresahuje 10kDa. V rámci druhej triedy sú podľa (*Acedo et al., 2018) rozoznávané 4 podtriedy. Každá podtrieda je opäť niečím charakteristická. Podtrieda IIa označovaná aj ako peptidy podobné pediocínu, majú konzervovaný N-terminálny motív, obsahujú aspoň jeden disulfidický mostík a amfipatický α -helix a nesú kladný náboj (*Zimina et al., 2020). Za zmienku stoja aj dvojpeptidové bakteriocíny podtriedy IIb. Jedná sa o bakteriocíny, zložené z dvoch, samostatne syntetizovaných peptidov, pričom antimikróbný účinok je najvyšší v prítomnosti oboch peptidových zložiek v rovnakom pomere (Nissen-Meyer et al., 1992).

Trieda III zahŕňa bakteriolyzíny a nelytické bakteriocíny. Bakteriocíny tejto triedy sú väčšie molekuly ako bakteriocíny triedy I a II. Lysostafín, jeden z bakteriolyzínov s molekulovou hmotnosťou okolo 30kDa, štiepi peptidovú väzbu medzi glycínmi v pentaglycinových mostíkoch peptidoglykanu baktérií rodu *Staphylococcus* (Chandra Ojha et al., 2018). Iné bakteriolyzíny sa líšia v konkrétnej peptidovej väzbe, ktorú hydrolyzujú (Gargis et al., 2009) avšak výsledok je rovnaký, narušenie integrity bunecnej steny vedie k lýze bunky (Khan et al., 2013). Veľkosť nelytických bakteriocínov sa pohybuje

v podobnom rozmedzí. Dysgalakticin o veľkosti 21,5 kDa (Swe et al., 2009) a dvakrát väčší kaseicin 80 (Müller & Radler, 1993) patria do tejto podtriedy. Ich mechanizmus účinku spočíva v narušení metabolizmu glukózy. Dysgalakticin interaguje s Man-PTS systémom, ktorý bližšie predstavím neskôr, v súvislosti s mikrocínom E492 (Swe et al., 2009).

1.2 Bakteriocíny produkované gramnegatívnymi baktériami

Prvou skupinou bakteriocínov produkovaných gramnegatívnymi baktériami sú už spomínané kolicíny. Ich mechanizmus účinku spočíva v tvorbe póru v bakteriálnej membráne alebo v degradácii nukleových kyselín (Parker et al., 1989; Schaller & Nomura, 1976). Avšak existujú aj iné mechanizmy, príkladom je kolicín M, ktorý enzymaticky degraduje prekuzory peptidoglykanu a vedie k inhibícii jeho syntézy (El Ghachi et al., 2006). Ďalším príkladom je kolicín Z, ktorý taktiež cieľi na peptidoglykan (Mícenková et al., 2019). Veľkosť kolicínov je variabilná, pohybuje sa od 10,4 kDa v prípade kolicínu Js (Šmajš & Weinstock, 2001), až po 75 kDa veľkého kolicínu D (Roos et al., 1989). Kolicíny sú na základe spôsobu akým sú transportované do cieľovej bunky klasifikované do dvoch skupín. Rozlišujeme skupinu A, ktorá využíva transportný systém Tol a zahŕňa kolicíny A, E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y (Davies & Reeves, 1975a). Kolicíny B, D, Ia, Ib, M, 5, a10 patria do skupiny B a do bunky sú importované cez TonB systém (Davies & Reeves, 1975b).

Bakteriocíny sú okrem *Escherichia coli* produkované aj inými gramnegatívnymi baktériami. Sú označované ako bakteriocíny podobné kolicínom a ich názvy sú odvodené podľa mena produkujúcej baktérie. *Klebsiella pneumoniae* produkuje klebicíny (Riley et al., 2001), *Yersinia pestis* pesticíny (Rakin et al., 1996), *Serratia marcescens* produkuje marcescíny (Fuller & Horton, 1950). Takáto nomenklatura však často neplatí. *Citrobacter freundii* produkuje kolicin A (Varenne et al., 1981), *Shigella boydii* produkuje kolicin U (Šmajš et al., 1997) a *Yersinia frederiksenii* produkuje kolicín Fy (Bosák et al., 2012). Druhou skupinou sú bakteriocíny s veľkosťou menšou ako 10kD. Ich objavitelia ich nazvali mikrocíny (Asensio et al., 1976). Kapitola 2 bude zamerané práve na tieto antimikróbne peptidy.

Tabuľka 2 - Klasifikácia gramnegatívnych bakteriocínov. V stĺpci s príkladmi sú červenou farbou vyznačené bakteriocíny, ktoré štiepia nukleové kyseliny. Kolicíny E2, E7, E8, E9, klebicin B a pyocin S4 štiepia DNA. Kolicíny E3, E4 a E6 hydrolyzujú ribozomálnu RNA a kolicín D štiepy tRNA. Kolicín M a pesticin, vyznačené zelenou farbou štiepia peptidoglykan. Zvyšné, farebne neoznačené bakteriocíny tvoria pór v membráne cieľovej bunky. Mikrocíny, vyznačené modrou farbou budú pojednané samostatne v ďalších kapitolách. Táto tabuľka bola vytvorená podľa prehľadového článku o kolicínoch (*Cascales et al., 2007). Ďalšie informácie boli doplnené z prác citovaných v tejto kapitole. Informácie o mikrocínoch boli doplnené z Obrázku 1.

Trieda	Podtrieda	Charakteristika	Príklad
Kolicíny 10-75kDa	A	Import cez Tol systém	A, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, K, L, N, S4, U, Y
	B	Import cez Ton B systém	B, D, Ia, Ib, M, 5, 10
Bakteriocíny podobné kolicínom	Produkované inými gramnegatívnymi baktériami. Veľkosťou a mechanizmom účinku sú podobné kolicínom		Pyocin S4, pesticin, klebicin B, pyocin S5
Mikrocíny <10kDa	I	<5 kDa	C7, B17, J25
	II	<10kDa	E492, M, L, V, N
Bakteriocíny podobné chvostu bakteriofágov	Typ R	Obsahujú kontraktilný plášť	Pyocin R2
	Typ F	Neobsahujú kontraktilný plášť	Pyocin F1

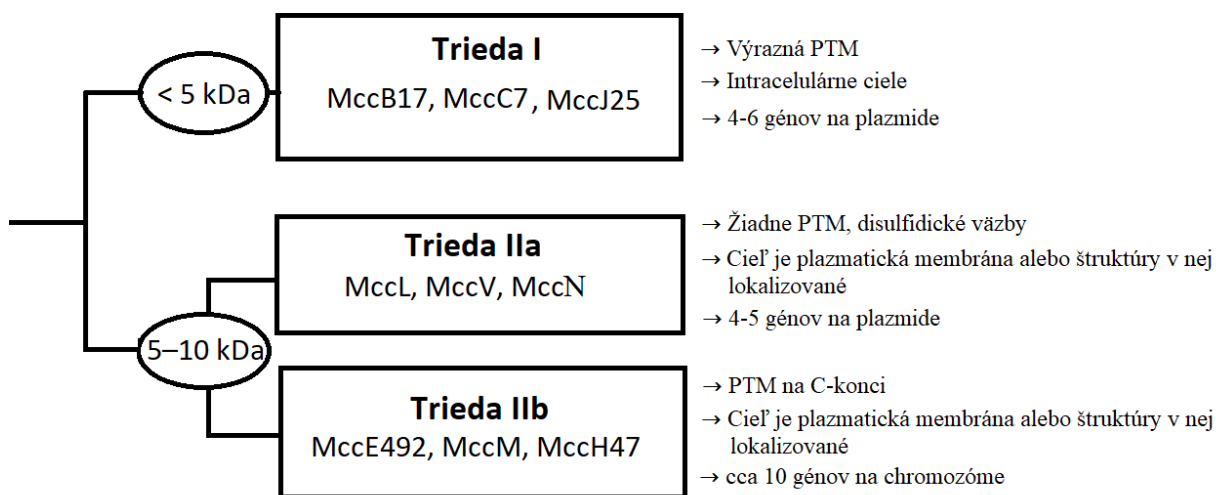
Odlišnou a zaujímavou skupinou sú bakteriocíny podobné chvostu bakteriofága (phage-tail like bacteriocins - PTLB). Jedná sa o štruktúry zložené zo stoviek helikálne usporiadaných proteínových podjednotiek, pozorovateľných v elektrónovom mikroskope (Takeda & Kageyama, 1975). PTLB sú štruktúrne homologické s chvostom bakteriofágov, ktorý slúži na penetráciu bakteriálnej membrány a transport DNA a proteínov do hostiteľskej bunky. Homológia s chvostom bakteriofága nie je náhodná ale daná evolučnou príbuznosťou a okrem PTLB pozorovaná aj u sekrečného systému typu VI (Lee et al., 2016, Leiman et al., 2009). Na rozdiel od sekrečného systému typu VI, PTLB nesprostredkujú žiaden transport. Ich toxicita spočíva v zabudovaní sa do membrány hostiteľskej bunky a tvorbe póru (Ge et al., 2015). Prvými objaveným a najviac preskúmanými PTLB sú pyocíny produkované *Pseudomonas Aeruginosa* (Jacob, 1954). Podľa štruktúry a spôsobu inzercie do membrány rozlišujeme dva typy pyocínov: R a F (Kuroda & Kageyama, 1979; Takeda & Kageyama, 1975). Existujú aj pyocíny typu S, tie však fungujú podobne ako nukleázové kolicíny (Elfarash et al., 2012), alebo pórtvorné kolicíny (Elfarash et al., 2014). Okrem pyocínov sú známe aj PTLB produkované inými gramnegatívnymi baktériami, napríklad *Pragia fontium* a *Budvicia aquatica* (Šmarda & Benada, 2005).

2 Mikrocíny

Mikrocíny patria k ribozomálne syntetizovaným a posttranslačne modifikovaným peptidom (RiPP). RiPP môžeme chápať ako základné prírodné produkty, akými sú okrem iných aj terpenoidy, alkaloidy, polyketidy a neribozomálne syntetizované peptidy (*Arnison et al., 2013). Od kolicínov sa mikrocíny líšia predovšetkým menšou veľkosťou, na základe ktorej boli podľa Asensio et al., (1976) kategorizované do jednej skupiny. Ďalšou charakteristikou mikrocínov je výrazná posttranslačná modifikácia (PTM), aj keď toto tvrdenie neplatí pre mikrocíny triedy IIa (Azpiroz & Laviña, 2007; Corsini et al., 2010; Pons et al., 2004). Odlišný je aj spôsob exportu mikrocínov a kolicínov z produkujúcej bunky, o čom sa ešte zmienim v kapitole o transporte mikrocínov (2.5.1).

2.1 Klasifikácia

Rozdelenie mikrocínov do dvoch skupín navrhli Gaillard-Gendron et al., (2000). Urobili tak predovšetkým na základe molekulovej hmotnosti a lokalizácie toxicity (intracelulárne ciele účinku pre triedu I a cytoplasmatická membrána pre triedu II). Toto rozdelenie bolo neskôr upravené vďaka údajom o zložení genetických determinant a miere post-translačných modifikácií. Na Obrázku 1 je zhrnutie klasifikácie podľa *Duquesne et al., (2007).



Obrázok 1 – Klasifikácia mikrocínov vytvorená podľa prehľadového článku Duquesne et al., (2007). Ďalšie charakteristiky boli doplnené z článkov citovaných v kapitole genetické determinanty.

Podľa *Parker & Davies, (2022) boli osekvenované genetické determinanty pätnástich mikrocinov. Ani na Obrázku 1, ani ďalej v tejto práci nemám spomenutých všetkých 15 mikrocinov nakoľko mnoho z nich, napríklad mikrocin S (Zschüttig et al., 2012), nebolo izolovaných a veľa informácií k nim zatiaľ neexistuje. Navyše, vďaka napredujúcim bioinformatickým metódam budú v blízkej budúcnosti nachádzané nové mikrocinové rýchlým tempom akým to bolo doteraz (*Cole et al., 2022). Mojm cieľom teda nie je podrobne charakterizovať všetky mikrocinové ale popísať a medzi sebou porovnať predovšetkým tie najlepšie preskúmané.

2.2 Genetické determinanty

Oblasť zodpovedná za produkciu mikrocinov je zložená z viacerých génov a môže sa nachádzať na plazmide alebo chromozóme. Spoločným znakom pre všetky mikrocinové je prítomnosť jedného génu kódujúci samotný peptid, jedného alebo viacerých génov zodpovedných za produkciu modifikačných enzýmov, ďalej génov umožňujúcich export mikrocinu do prostredia a génov zabezpečujúcich imunitu produkujúcej bunky. Každý mikrocin má svoje vlastné špecifické usporiadanie génov a špecifickú reguláciu transkripcie. Mikrocinové v rámci jednotlivých tried sú si však v tomto aspekte podobné, a to nakoľko, že niektoré gény sú u príbuzných mikrocinov medzi sebou zameniteľné (Vassiliadis et al., 2010). Trieda IIa je charakteristická štyrmi alebo piatimi génmi, usporiadanými do dvoch alebo do jednej transkripčnej jednotky (Corsini et al., 2010; Gilson et al., 1987; Pons et al., 2004). Gény mikrocinov triedy IIb sú naopak lokalizované priamo na chromozóme produkujúcej bunky, zložené z desiatich génov usporiadaných, v prípade mcc E492, až do siedmich transkripčných jednotiek (Lagos et al., 2001; Vassiliadis et al., 2010). Genetické determinanty mikrocinov triedy I sú lokalizované na plazmide, obsahujú štyri až šesť génov. Gény pre syntézu mikrocinu sú zoskupené v operóne a gén pre imunitu je transkribovaný samostatne, v prípade mccC7 v opačnom smere (Eduardo Gonza et al., 1995; Li et al., 2021; San Millan, et al., 1985; Solbiati et al., 1996).

K transkripcii týchto génov a produkcii mikrocinov dochádza v stacionárnej fáze rastu bakteriálnej kultúry a v exponenčnej fáze je prakticky nulová (Chico et al., 1986). Avšak neplatí to pre všetky mikrocinové. Zatiaľ nie je jasné prečo, ale produkcia mccE492 a mccN vrcholí počas exponenciálneho rastu (Corsini et al., 2010; de Lorenzo, 1984).

Na záver tejto kapitoly sa ešte zmienim o látkach podobných mikrocinom („microcin-like substances“). Genetické determinanty homologické mccC7 z *Escherichia coli* boli nájdené v grampozitívnych baktériách a dokonca aj v cyanobaktériách (Bantysch et al., 2014). Produkty týchto génov sú podobné mccC7 avšak nie totožné, odlišný je aj ich počet a usporiadanie v génovom zhluku (Serebryakova et al., 2016). O možnom horizontálnom genetickom presone mccC7 v rámci enterobaktérií mccC7 sa na základe obsahu G+C párov zmieňuje Fomenko et al., (2003), a o presone

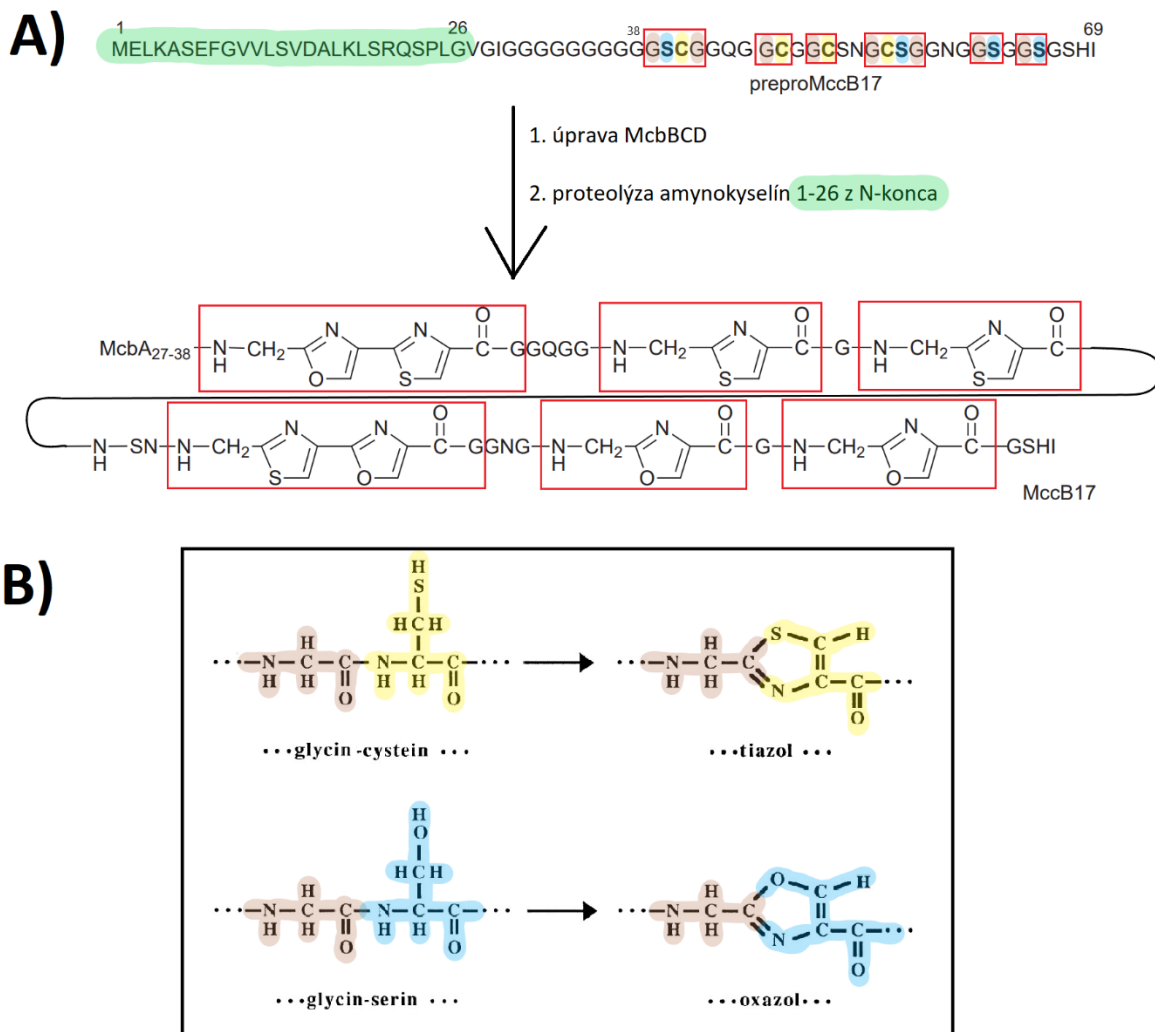
z enterobaktérií do cyanobaktérií rodu *Synechococcus* uvažujú aj Paz-Yepes et al., (2013). Horizontálny genetický prenos medzi rôznymi druhmi a vyššími taxonomickými skupinami nie je častý ale tiež sa deje (Redondo-Salvo et al., 2020). Všeobecne sa dá povedať, že evolúčná história mikrocinov je iba málo preskúmaná téma.

2.3 Štruktúrna pestrosť mikrocinov a úloha post-translačných modifikácií

Štruktúrna rôznorodosť mikrocinov je daná rozsahom posttranslačných úprav. V prípade *mccC7* sú PTM tak výrazné, že z ribozomálne syntetizovaného peptidového prekursoru ostane prítomná jediná aminokyselina (Roush et al., 2008). Naopak u mikrocinov z triedy IIa k žiadnym PTM nedochádza (Corsini et al., 2010; Pons et al., 2004). Najväčšie rozdiely v štruktúre a procese PTM nájdeme v rámci mikrocinov skupiny I. Preto v tejto kapitole bližšie predstavím troch zástupcov tejto triedy: *mccB17*, *mccC7* a *mccJ25*. Najlepšie preskúmaným zástupcom triedy IIb je *mccE492*, preto ho bližšie predstavím v tejto kapitole aj v kapitole o mechanizme účinku (2.4.4).

2.3.1 Mikrocin B17

Maturácia *mccB17* sa skladá z dvoch krokov, zobrazených na Obrázku 2. Samotná peptidová kostra *mccB17* vzniká transkripciou a transláciou génu *mcbA*, skladá sa zo 69 aminokyselín a označuje sa ako *preMccB17* (Yorgey et al., 1993). Za jeho maturáciu zodpovedá komplex mikrocin B17 syntáza, zložený z troch enzýmov *McbBCD*. Tie katalyzujú tvorbu štyroch oxazolových a štyroch tiazolových heterocyklov celkom zo šiestich glycínov, štyroch serínov a štyroch cysteínov. Katalýza zahŕňa cyklizáciu, dehydrogenáciu a dehydratáciu (Li et al., 1996). Vzniká upravený, 43 aminokyselín dlhý *proMccB17* (Davagnino et al., 1986). Na záver je odstrihnutých 26 aminokyselinových zvyškov z N-konca peptidu, ktoré slúžili ako miesto rozpoznania a naviazania modifikačných enzýmov (Madison et al., 1997).



Obrázok 2 – A) Posttranslačné úpravy prekursoru preproMccB17 (niekde označovaný iba ako preMccB17) prebieha v dvoch krokoch. Prvým je úprava komplexom enzýmov McbBCD, potom následuje proteolýza aminokyselín 1-26 z N-konca peptidu, vyznačené zelenou farbou. Výsledkom je 43 aminokyselín dlhý peptid, ktorý obsahuje 2 bisheterocykly a 4 heterocykly thiazolu a oxazolu, zvýraznených v červených rámečkoch. Obrázok prevzatý z práce Roy et al., (1999) **B)** Schématicky diagram posttranslačnej úpravy komplexom McbBCD prevzatý z práce Madison et al., (1997) približuje akým spôsobom dochádza k vzniku thiazolu a oxazolu.

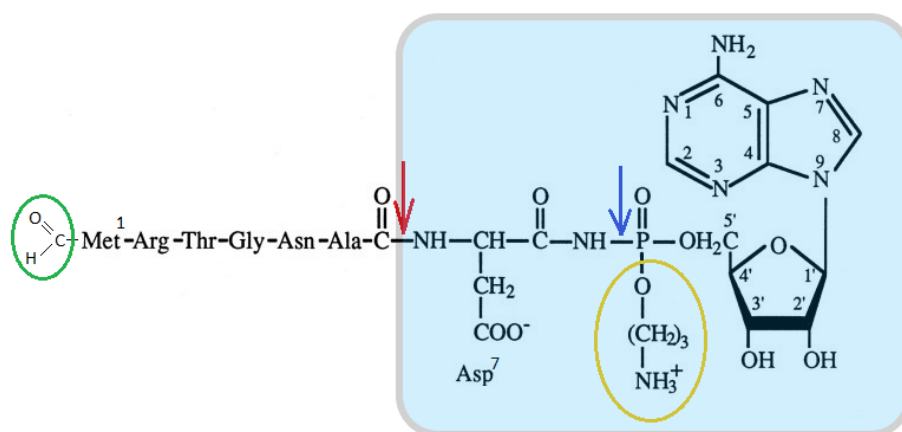
2.3.2 Mikrocín J25

K podobnej syntéze ako je opísaná vyššie dochádza aj v prípade mccJ25. Posttranslačnú modifikáciu zabezpečujú enzýmy mcjB a mcjC, ktoré spolu asociujú a vytvárajú komplex autormi Yan et al., (2012) nazvaný mikrocín J25 syntetáza. Katalyzujú tvorbu intramolekulárnej peptidovej väzby medzi prvou a ôsmou aminokyselinou mikrocínu, čím tvoria kruh (Gly¹-Glu⁸), cez ktorý je prevlečený a nekovalentne prichytený C-koniec peptidu (Wilson et al., 2003). Následuje odštiepenie 37

aminokyselín dlhej vedúcej sekvencie (leader sequence) a výsledkom je maturovaný mccJ25 o dĺžke 21 aminokyselín (Blond et al., 1999).

2.3.3 Mikrocín C7

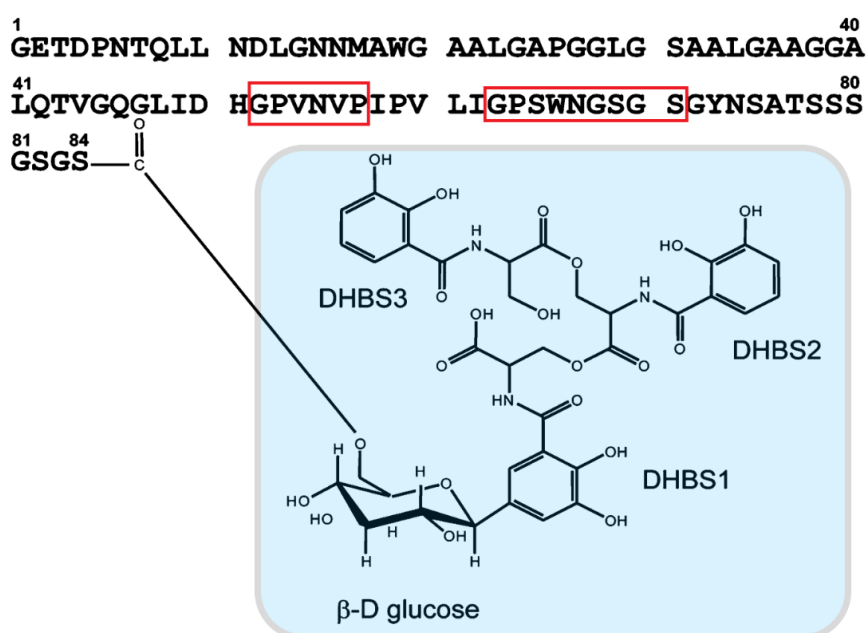
Prekuzorom pre syntézu mccC7 je heptapeptid: fMet-Arg-Thr-Gly-Asn-Ala-Asp, produkt génu *mccA* o dĺžke iba 21 párov báz (González-Pastor et al., 1994; Guijarro et al., 1995). Pri posttranslačnej modifikácii dochádza k tvorbe N-acylfosforamidovej väzby medzi dusíkom modifikovaného aspartátu 7 a fosfátom ATP, pričom vzniká peptid aspartamid-adenylát. Táto reakcia sa skladá z viacerých krokov, najprv dochádza k premene asparagínu 7 na aspartát s amidovou skupinou a následne k vzniku väzby s fosfátom ATP (Roush et al., 2008). Enzým katalyzujúci túto reakciu, MccB, je bakteriálny predchodca eukaryotického ubiquitin aktivačného enzýmu E1 (EC 6.2.1.45). Ten adenyluje ubiquitine-like proteiny, čím aktivuje ubiquitinylačnú kaskádu (Regni et al., 2009). K peptid aspartamid adenylátu je následne ešte cez atom kyslíka napojená 3-aminopropylová skupina zvyšujúca mikrobiálnu aktivitu (na Obrázku 3 zvýraznená v žltom kruhu). Za túto úpravu zodpovedajú ďalšie dva modifikačné enzýmy (Metlitskaya et al., 2009). K finálnej úprave mccC7 dochádza až v cieľovej bunke. Nešpecifické peptidázy hydrolyzujú peptidovú väzbu Ala⁶-Asp⁷ (na Obrázku 3 zvýraznené červenou šípkou) za vzniku upraveného aspartát-AMP. Prekuzor mccC7 neobsahuje vedúcu sekvenciu ako to je v prípade mccB17 alebo mccJ25. Enzým MccB však pre väzbu a katalýzu vyžaduje formylovú skupinu na metioníne (na Obrázku 3 vyznačená zeleným kruhom) (Dong et al., 2019).



Obrázok 3 – Chemická štruktúra molekuly mikrocínu C7, prevzatá z práce Guijarro et al., (1995). V modrom rámečku je zvýraznená posttranslačná modifikácia heptapeptidu mccC7, zároveň znázorňuje jeho plne maturovanú formu, ktorá vzniká hydrolýzou väzby s červenou šípkou. Modrá šípka ukazuje na N-acylfosforamidovú väzbu. V žltom kruhu je vyznačená 3-aminopropylová skupina. V zelenom kruhu je vyznačená formylová skupina na amino skupine metionínu.

2.3.4 Mikrocín E492

V štruktúre maturovaného mceE492 nájdeme neribozomálne syntetizovaný peptid: glykosylovaný trimér N-(2,3- dihydroxybenzoyl)-L-serine (DHBS₃). Jedná sa o upravený enterochelín, bakteriálny sideroforový peptid, ktorého úlohou je z prostredia vychytávať železité kationy (Nolan et al., 2007; Pollack & Neilands, 1970). DHBS₃ je esterovou väzbou cez molekulu glukózy pripojený na C-koniec ribozomálne syntetizovanej peptidovej kostry MceA (Obrázok 4). Na PTM sa podieľajú štyri proteíny: MceCDIJ, všetky sú súčasťou chromozomálne lokalizovaného génového klastru pre syntézu mceE492 (Lagos et al., 2001). Enzýmy MceC (glykosyltransferáza) a MceD (esteráza) modifikujú (glykosylujú a linearizujú) enterochelín, zatiaľčo enzymatický komplex MceIJ katalyzuje jeho pripojenie na C-koniec MceA (Corsini et al., 2002; Nolan et al., 2007).



Obrázok 4 – Štruktúra mceE492 prevzatá z práce Destoumieux-Garzón et al., (2006). V modrom rámečku je zvýraznená posttranslačná modifikácia. V červených rámečkoch sú vyznačené aminokyseliny ktoré tvoria man-PTS rozpoznávaciu doménu, o ktorej sa ešte zmienim v kapitole o mechanizme účinku (2.4.4).

Vyššie popísaná PTM charakterizuje aj mceH47 a mceM, ďalšie mikrocíny triedy IIb, a zabezpečuje ich transport cez sideroforové receptory do periplazmatického priestoru bunky (Vassiliadis et al., 2010). Bakteriocídny efekt je zabezpečený samotnou peptidovou časťou týchto mikrocínov (Bieler et al., 2006). V prípade mceH47 a mceM sa táto peptidová časť odlišuje od mceE492 nie len sekvenčne, ale aj mechanizmom účinku (Rodríguez & Laviña, 2003). Naopak, mceN (z triedy IIa) je sekvenčne homologický s mceE492 (IIb) (Corsini et al., 2010). Medzi spoločné znaky oboch tried (IIa a IIb) patria vedúce sekvencie s motívom glycín-glycín, funkčne spojené s ABC-transportným

systémom (Corsini et al., 2010; Havarstein et al., 1995; Pons et al., 2004). Sekvenčná homológia v peptidovej časti mikrocínov oboch tried poukazuje na ich evolučnú príbuznosť (*Vassiliadis et al., 2011). V ďalšej kapitole ukážem ako špecifické PTM umožňujú mikrocínom interagovať s konkrétnymi štruktúrami, či už na bunečnom povrchu (trieda II) alebo vo vnútri bunky (trieda I).

2.4 Mechanizmus účinku

Mechanizmus účinku mikrocínov je pestrý. Zatiaľ čo ciele mikrocínov triedy I sú intracelulárne lokalizované bunečné enzýmy, mikrocíny triedy II narušajú elektrochemický gradient poškodením integrity plazmatickej membrány, mechanizmus používaný mnohými bakteriocínmi (*Simons et al., 2020). MccE492 (IIa) a mccV (IIb) tvoria v membráne póry avšak používajú rozdielne membránové proteíny ako receptor (Gérard et al., 2005; Huang et al., 2021). V prípade mikrocínu H47 (IIb), žiaden pór formovaný nie je a ku narušeniu protónového gradientu dochádza prostredníctvom interakcie s F_0 podjednotkou ATP-syntázy (Rodríguez & Laviña, 2003). Bližšia charakteristika tejto interakcie zatiaľ neexistuje. V prípade mccL (IIa), sa nezistila tvorba póru a nenašiel sa ani mechanizmus, ktorým k narušeniu protónového gradientu dochádza (Morin et al., 2011). Rovnako neznámy je zatiaľ mechanizmus účinku mccN (IIa). Predpokladá sa, že mechanizmus účinku mccM (IIb) je podobný ako mccH47 (IIb) ale overené to doposiaľ nebolo (*Massip & Oswald, 2020).

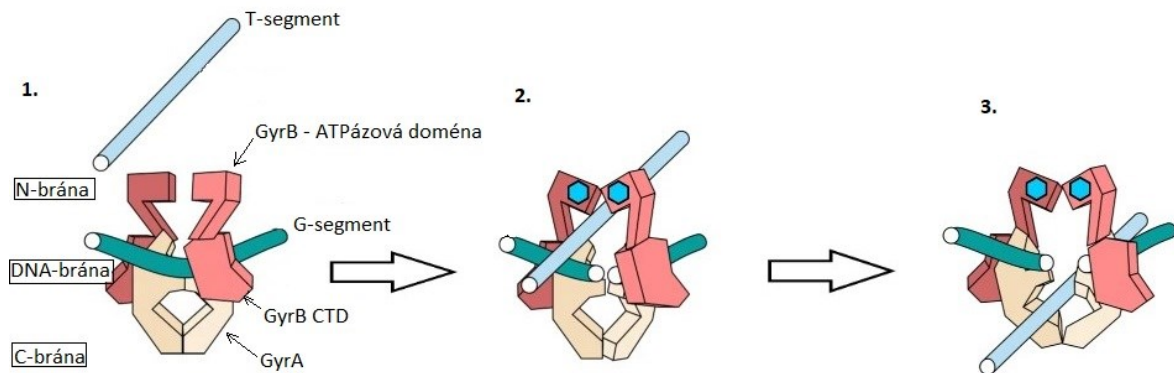
Z horného odstavca vyplýva, že ohľadom mechanizmu účinku mikrocínov triedy II ostáva veľa nejasností. Naopak mikrocíny triedy I sú lepšie preskúmané, a preto som sa rozhodol ich mechanizmu účinku v tejto práci venovať viac pozornosti. Predstavím aktuálne poznatky o troch zástupcoch tejto triedy: mccB17, mccJ25 a mccC7. Ako som som avizoval v predchádzajúcej kapitole, priblížim aj mechanizmus účinku mccE492.

2.4.1 Mikrocín B17

Po vystavení exponenciálne rastúcej kultúry *Escherichia coli* mikrocínu B17 dochádza do tridsiatich minút k úplnému zastaveniu replikácie DNA a spusteniu SOS reparačnej dráhy (Herrero & Moreno, 1986). *In vitro* boli pozorované dvojreťazcové zlomy plazmidovej DNA v prítomnosti mccB17 (Vizán JL et al., 1991).

DNA gyráza patrí k topoizomerázam II. Ako vyplýva z názvu, sú to enzýmy, ktoré menia topológiu molekuly DNA prostredníctvom dočasných dvojreťazcových zlomov DNA. To je nevyhnutné napríklad pri replikácii, kedy sa vplyvom posunu replizómu hromadí napätie v molekule DNA. DNA gyráza je špecifická tým, že dokáže využiť energiu hydrolýzy ATP na vloženie negatívnych nadobrátk do molekuly DNA. Skladá sa z proteínov GyrA a GyrB, ktoré tvoria heterotetramér A_2B_2 . Dimér A_2

umožňuje štiepenie molekuly DNA za vzniku dočasných kovalentných intermediátov s enzýmom a následnú ligáciu DNA. Obe podjednotky GyrB diméru B₂ majú ATPázovú aktivitu, ktorá umožňuje a reguluje konformačné zmeny (*Reece et al., 1991). Bližší popis mechanizmu DNA gyrázy je na Obrázku 6.

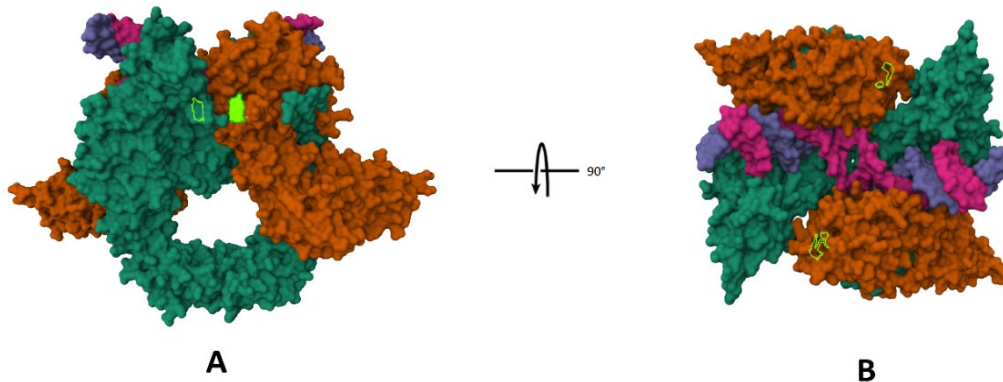


Obrázok 6 - (1.) GyrA a GyrB vytvárajú brány (N,DNA a C-brána), ktorými postupne prechádzajú vlákna DNA. Najprv dochádza k väzbe G-segmentu DNA, následne T-segmentu DNA. **(2.)** N-brána sa uzavrie po tom, čo ňou prejde T-segment, zároveň dôjde k zmene konformácie v DNA-bráne, spojenej so vznikom dvojvláknového zlomu v G-vláknke. **(3.)** Následuje prechod T-vláknka. Religácia G-vláknka je sprostredkovaná uzavrením DNA-brány a otvorenie C-brány vedie k disociácii T-vláknka (tento posledný krok už na obrázku zobrazený nie je). Otváranie a zatváranie brán je regulované naviazaním a hydrolýzou ATP (ATP je reprezentované modrými šesťuholníkmi) (Gubaev & Klostermeier, 2014). Obrázok je prevzatý a úpravený podľa Michalczyk et al., (2023).

Doposiaľ bola nájdená iba jediná mutácia DNA gyrázy zabezpečujúca rezistenciu voči mcb17. Je to zámena tryptofánu za arginín na pozícii 751 podjednotky GyrB (Obrázok 7) (Vizán JL et al., 1991). Dôležitý je pritom aromatický charakter tryptofánu, nakoľko zámena za histidín alebo fenylalanín rezistenciu neposkytuje (Del Castillo et al., 2001). Ako hypotetizujú autori prehľadového článku Collin a Maxwell, (2019), je možné že tu dochádza k „base-stacking“ interakciám s azolovými heterocyklami mikrocínu, ktoré sú nevyhnutné pre jeho inhibičný účinok (Sinha Roy et al., 1998). Naopak Parks et al., (2007) na základe rozloženia bis-heterocyklov v štruktúrnom modeli mcb17 navrhli že k týmto base-stacking interakciám mcb17 môže dochádzať s bázami DNA, ako to je v prípade bleomycínu. Je možné, že dochádza k obom týmto interakciám, ako v prípade antimikróbneho peptidu Albicidínu, ktorého mechanizmus účinku bol objasnený len nedávno (Michalczyk et al., 2023). Tryptofán 751 sa však nachádza na povrchu DNA gyrázy, nie v bezprostrednej blízkosti DNA (Obrázok 7), preto nemôžeme vylúčiť alosterickú inhibíciu, pozorovanú napríklad v prípade thiophenu (Chan et al., 2017).

Jediná mutácia nám neumožňuje zmapovať interakciu mcb17 s DNA gyrázou, avšak dá sa využiť aj iná metóda. Porovnaním fragmentov trypsínovej proteolýzy DNA gyrázy v prítomnosti

a v neprítomnosti mcbB17 Pierrat & Maxwell, (2005) ukázali, že 47kDa veľký fragment C-terminálnej domény Gyr-B je v prítomnosti mikrocinu chránený pred proteolytickou degradáciou. To naznačuje, že k interakcii by mohlo dochádzať v tejto oblasti gyrázy. Práve tu sa nachádza aj vyššie spomínaná mutácia tryptofánu 751. Ako presne však k interakcii dochádza nevieme, nakoľko neexistujú 3D štruktúry DNA gyrázy s naviazaným mcbB17.



Obrázok 7 Pohľad **A**) z boku a **B**) zhora na cryo-EM štruktúru DNA gyrázy *Escherichia coli*. Pre prehľadnosť chýbajú časti tvorené C-koncovou doménou GyrA a N-koncovou doménou GyrB. Oranžovou farbou sú znázornené podjednotky GyrB, tmavo-zelenou podjednotky GyrA. Povrch tvorený tryptofánom 751 je znázornený šrafované svetlozelenou farbou. Obrys bez šrafovania reprezentuje tryptofán 751 v zákryte. Snímka je získaná z Mol*PDB ID: 6RKU, (Vanden Broeck et al., 2019).

Pierrat a Maxwell, (2005) tiež ukázali, že pre inhibíciu mikrocinom je potrebný prechod T-segmentu DNA-bránou (krok 2 na Obrázku 6) a navrhli, že sa mcbB17 viaže na dočasný konformačný stav, ktorý pri tomto prechode vlákna DNA vzniká. V tomto kroku účinkujú aj fluoroquinolony, látky ktoré sa interkalujú do rozštiepeného vlákna DNA a blokujú religáciu (*Bush et al., 2020). MccB17 stimuluje predovšetkým štiepenie druhého vlákna G-segmentu (Pierrat & Maxwell, 2003), čo naznačuje že preferuje konformačný stav, ktorý vzniká až po rozštiepení prvého vlákna G-segmentu DNA. Každopádne, výsledkom je, že mcbB17 stabilizuje komplex DNA gyrázy kovalentne naviazanej k DNA (Heddle et al., 2001), čo vedie jednak k zastaveniu replikácie, ale predovšetkým k hromadeniu dvojvláknových zlomov v molekule DNA (Vizán JL et al., 1991). Zlomy v DNA aktivujú reparačné mechanizmy, ktoré zvyšujú pravdepodobnosť prežitia bakteriálnej bunky (Herrero & Moreno, 1986). Pre spustenie SOS reparačnej dráhy musí byť DNA gyráza odstránená z DNA a dvojvláknové zlomy musia byť exponované. V prípade fluoroquinolonov to je prostredníctvom nukleáz, proteáz alebo disociáciou podjednotiek DNA gyrázy (*Bush et al., 2020). Pravdepodobne to tak bude aj pri mikrocinu B17.

Cieľom mikrocínu B17 je DNA gyráza, bližší popis mechanizmu účinku je však limitovaný chýbajúcou 3D štruktúrnou analýzou naviazaného mikrocínu na svojom cieľi. Objasnenie funkcie mccB17 by bolo prínosné pri vývoji nových antibakteriálnych látok zameraných proti DNA gyráze. Vzhľadom na neustály nárast rezistencie patogénnych kmeňov *Escherichia coli* voči fluorochinolónom, často predpisovaným širokospektrálnym antibiotikám s podobným mechanizmom účinku ako mccB17, má takýto vývoj zmysel (Gagliotti et al., 2011).

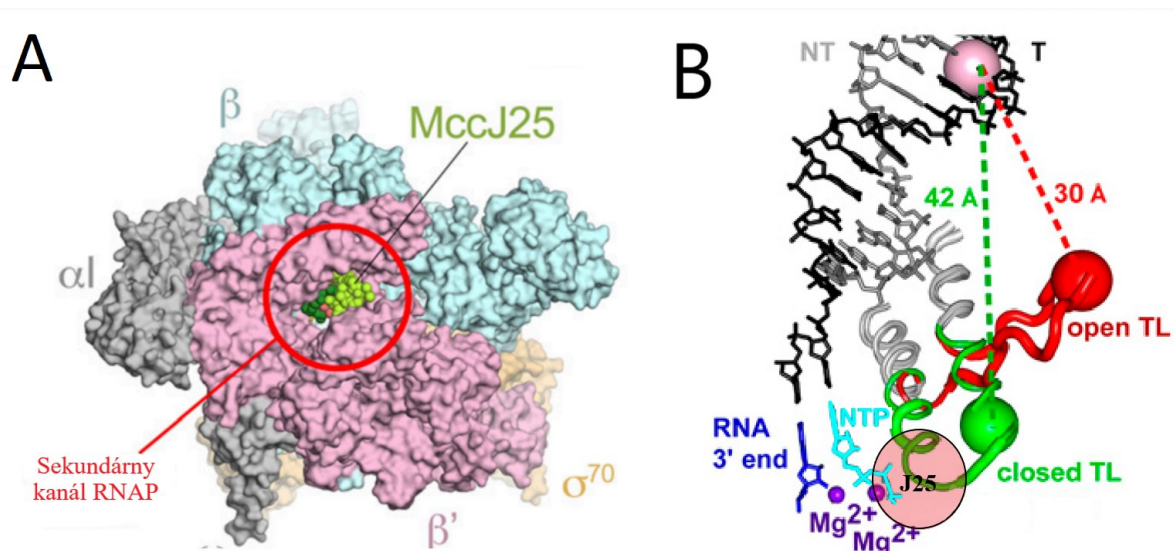
2.4.2 Mikrocín J25

Antimikróbný účinok mccJ25 na bakteriálnu bunku je sprostredkovaný dvoma, na sebe nezávislými mechanizmami. Jedným cieľom je bakteriálna RNA polymeráza (RNAP), druhým je enzým dýchacieho reťazca, cytochróm bd-I (Bellomio et al., 2007, Galván et al., 2019).

Mikrocín J25 inhibuje RNA polymerázu

Mutácie zabezpečujúce rezistenciu proti mccJ25 vedú k zámenám aminokyselín lokalizovaných v sekundárnom kanáli β -podjednotky RNA polymerázy (RNAP) (Mukhopadhyay et al., 2004). Toto pozorovanie prvýkrát umožnilo lokalizovať účinok mccJ25, neskôr bolo potvrdené a detailnejšie zobrazené metódou röntgenovej kryštalografie (Obrázok 5A) (Braffman et al., 2019). Sekundárny kanál RNAP slúži ako vstupná brána pre nukleozidtrifosfáty (NTP) počas aktívnej transkripcie a poskytuje miesto pre 3' koniec RNA počas spätného posunu transkripčného komplexu tzv. „backtracking“. Taktiež funguje ako väzobné miesto pre regulačný faktor GreA, ktorého úlohou je odštiepiť kúsok RNA pri „backtrackingu“ (Esyunina et al., 2016).

Molekulárnou podstatou inhibície RNAP je interakcia peptidu s elementom β -podjednotky RNAP, tzv. „trigger loop“ (Braffman et al., 2019). Ten sa môže nachádzať v dvoch konformačných stavoch: otvorený pri absencii NTP a zavretý pri naviazaní NTP (Obrázok 5B). S každým pridaním nukleotidu k reťazci RNA dochádza k jednému cyklu otvoreného a zatvoreného stavu. Okrem toho „trigger loop“ zabezpečuje komplementaritu prichádzajúceho NTP k templátu. (Mazumder et al., 2020). Jedná sa teda o pohyblivý štruktúrny prvok aktívneho centra bakteriálnej, ale aj eukaryotickej RNAP. MccJ25 naviazaný v sekundárnom kanáli v blízkosti aktívneho centra enzýmu blokuje pohyb „trigger loop“ (Braffman et al., 2019). Vysoké koncentrácie NTP znižujú účinok mccJ25, čo naznačuje, že inhibícia mikrocínom je čiastočne kompetitívna. Z toho sa dá súdiť, že miesto kde sa viaže mikrocín nie je presne to miesto kde dochádza k interakcii NTP s RNAP (Mukhopadhyay et al., 2004). 3D štruktúrna analýza však odhalila, že miesta väzby mccJ25 a NTP sa prekrývajú. Inhibícia by teda mala byť úplne kompetitívna. Ako autori Braffman et al., (2019) navrhujú, pravdepodobným vysvetlením odlišných zistení sú termálne pohyby flexibilnej C-koncovej časti mccJ25, ktoré by umožnili čiastočné viazanie NTP do aktívneho miesta aj v prítomnosti mccJ25.



Obrázok 5 **A)** pohľad do sekundárneho kanála RNAP blokovaného mikrociénom J25. Prevzaté od Braffman et al., (2019). **B)** Trigger loop (TL) v otvorenom a zavretom stave. MccJ25 (vyznačený ako červený kruh) bráni pohybu TL, a čiastočne bráni väzbu NTP k aktívnemu miestu RNAP, čím dochádza k predĺžovaniu páуз počas elongačnej fázy RNAP. Prevzaté od Mazumder et al., (2020). Jedná sa o modely získané rentgenoštruktúrnou analýzou.

So stúpajúcou koncentráciou *mccJ25* bol pozorovaný pokles celkovej rýchlosti transkripcie. Za použitia metódy optickej pinzety Adelman et al., (2004) zistili, že rýchlosť pohybu elongačného komplexu (EC) po vlákne DNA v prítomnosti mikrociínu ostáva nezmenená, okolo 12,5 nukleotidu/s. Častejšie sú však pauzy EC, kedy dôjde k dočasnému zastaveniu pohybu. Vysvetlením by mohlo byť, že *mccJ25* blokuje prítomnosť už spomínaného faktora GreA v sekundárnom kanáli, nedôjde k odštiepeniu „backtracked“ RNA, čo vedie k predĺžovaniu páуз EC (Shaevitz et al., 2003). Toto by mohlo byť navyše k pohybu „trigger loop“ a blokovaniu NTP ďalší mechanizmus, ktorý sa podieľa na inhibícii RNAP.

Ako je zobrazené v Tabuľke 2, okrem *mccJ25* existujú aj iné antimikróbne peptidy s lassoštruktúrou. V prípade grampozitívnych baktérií majú iný mechanizmus účinku. Napríklad propeptin funguje ako inhibítor prolyl endopeptidázy (Kimura et al., 1997) a syamicin-I inhibuje syntézu peptidoglykanu (Tan et al., 2019). Existujú však aj lasso-peptidy gramnegatívnych baktérií. Acinetodin, klebsidin (Meteliev et al., 2017) a mikrociín Y (Han et al., 2022) tiež blokujú sekundárny kanál RNAP aj napriek úplne rozdielnej primárnej sekvencii.

Mikrociín J25 zvyšuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka

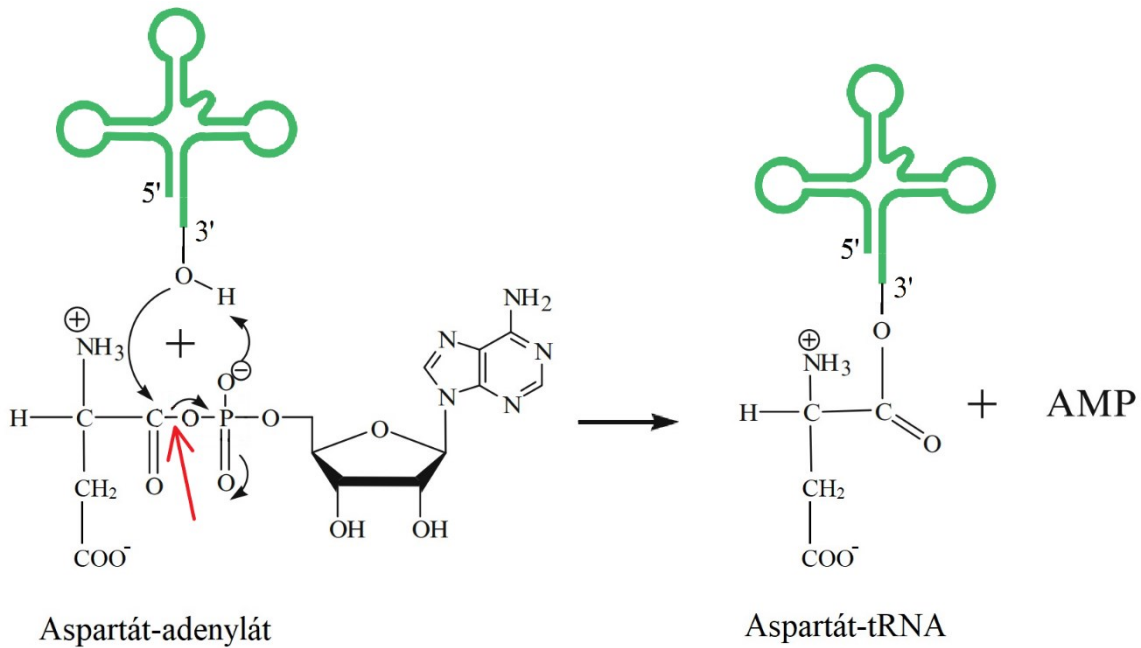
Druhý mechanizmus účinku *mccJ25* spočíva vo zvyšovaní intracelulárnej koncentrácie reaktívnych foriem kyslíka (Bellomio et al., 2007) v dôsledku interakcie *mccJ25* s cytochrómom bd-I

(Galván et al., 2019). Vznik reaktívnych foriem kyslíka je súčasťou oxidatívneho metabolizmu. Pri putovaní elektrónov respiračným komplexom, môže dôjsť k nekontrolovanému prenosu elektrónu na molekulu kyslíka a vzniku superoxidového radikálu alebo peroxidu vodíka (González-Flecha & Demple, 1995). Tieto reaktívne formy kyslíka (ROS) priamo ničia kľúčové bunecné enzýmy (Gardner et al., 1995; Sobota & Imlay, 2011), DNA (Imlay et al., 1988) aj membránové lipidy (Niki et al., 1991). Cytochróm bd-I je terminálna reduktáza. Prenáša elektróny z redukovaných chinónov na terminálne akceptory elektrónov za vzniku ich redukovaných foriem. V prípade aeróbného metabolizmu je terminálny akceptor kyslík a vzniká voda (*Borisov & Verkhovsky, 2015). MccJ25 inhibuje Cytochróm bd-I, čo vedie k zvýšenej tvorbe superoxidových radikálov.

Nedávno bol publikovaný prehľadový článok o mccJ25. Jeho autori Baquero et al., (2024), ktorý sa výzkumu mccJ25 venujú už tridsať rokov, zdôraznili veľa nejasností týkajúce sa tohto účinku mccJ25 na bunku. Upozorňujú, že tento efekt mccJ25 je pozorovateľný iba v kmeňoch alebo mutantoch so zvýšenou mierou importu mccJ25 do bunky. Ďalej poukazujú na fakt, že aj napriek tisícim známym mutantom s rezistenciou proti mccJ25, ani jeden nemá mutáciu v proteínoch respiračného reťazca. Na záver pripomínajú, že doposiaľ nebola popísaná presná interakcia mccJ25 s cytochrómom bd-I a konštatujú, že omnoho podstatnejší efekt mccJ25 na bakteriálnu bunku je inhibícia RNAP. Mohli by sme hypotetizovať, že na inhibícii rastu bunky oba mechanizmy spolupracujú. Ako navrhli Bellomio et al., (2007) , dávalo by to zmysel pri náhlej zmene prostredia z anaeróbného na aeróbné. V takej situácii by blokácia transkripcie neumožnila nasyntetizovať enzým superoxid dismutázu potrebný pre odstránenie akumulujúcich sa superoxidových radikálov, čo by viedlo k rýchlemu zničeniu bunky (Galván et al., 2019).

2.4.3 Mikrocín C7

Cieľom mikrocínu C7 je inhibícia proteosyntézy. Existuje viacej spôsobov ktorými antibiotiká blokujú syntézu proteínov. Tetracyklíny interagujú s malou podjednotkou ribozómu a bránia tým naviazaniu aminoacyl-tRNA do akceptorového miesta ribozómu (Suarez & Nathans, 1965), podobne fungujú aj thiopeptidové bakteriocíny grampozitívnych baktérií micrococcin a thiostrepton (Rosendahl & Douthwaite, 1994). Makrolidy interagujú s veľkou ribozomálnou podjednotkou a spôsobujú predčasnú termináciu translácie (*Menninger, 1995). MccC7 inhibuje enzým aspartyl-tRNA syntetázu (EC 6.1.1.12), jeden z dvadsiatich variant aminoacyl-tRNA syntetáz. Tieto enzýmy katalyzujú ligáciu aminokyseliny na molekulu tRNA s príslušným antikodónom. Ich produkty, tzv. nabité tRNA, sú nevyhnutné pre proteosyntézu (Metlitskaya et al., 2006).



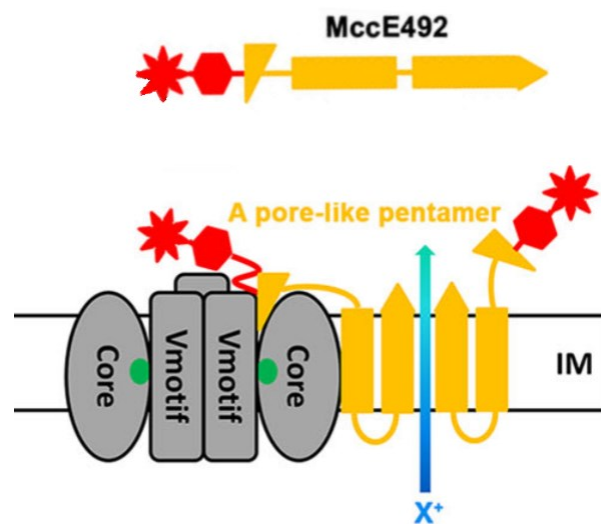
Obrázok 8 – druhý krok reakcie katalyzovanej aspartyl-tRNA syntetázou. Červenou šípkou je zvýraznená fosfoesterová väzba. Namiesto tejto väzby obsahuje *mccC7* fosforamidovú väzbu (Obrázok 3). Po naviazaní *mccC7* do aktívneho miesta enzýmu nedochádza k hydrolyze fosforamidovej väzby a aktívne miesto ostáva zablokované (Metlitskaya et al., 2006). Pohyb elektrónov, naznačený čiernymi šípkami, bol prevzatý z práce Banik & Nandi, (2012). Kostra molekuly tRNA (zelenou) bola doplnená z učebnice Lehninger Principles of Biochemistry 6th edition.

Reakcia aspartyl tRNA syntetázy sa skladá z dvoch krokov. V prvom dochádza k vzniku aspartyl-adenylátu z aspartátu a ATP. V druhom kroku, schématicky znázornenom na Obrázku 8, dochádza k tvorbe esterovej väzby medzi 3'OH tRNA a karbonylovým uhlíkom aspartátu (Berg & Offengand, 1958). Aminoacylový intermediát, v tomto prípade aspartát adenylát, je vysokoenergetická nestabilná molekula, čo umožňuje priebeh reakcie zobrazenej na Obrázku 8. Naopak stabilné analógy adenylátov aminokyselín sú inhibítormi tejto reakcie (Bernier et al., 2005). *MccC7* je jeden z takýchto analógov. Namiesto fosfoesterovej väzby obsahuje nehydrolyzovateľnú fosforamidovú väzbu. Po naviazaní *mccC7* do aktívneho miesta aspartyl tRNA syntetázy dochádza k jeho zablokovaniu (Metlitskaya et al., 2006). Konkrétne interakcie *mccC7* s Aspartyl tRNA syntetázou ešte nebola determinovaná.

2.4.4 Mikrocín E492

Zatiaľčo C-terminálna PTM zabezpečuje transport mikrocínov triedy IIb, baktericídny efekt je sprostredkovaný samotnou peptidovou kostrou (Bieler et al., 2006). Keď sa *mccE492* ocitne v periplazmatickom priestore cieľovej bunky, interaguje s integrálnymi membránovými proteínmi ManYZ, komponentmi manózoveho fosfotransferázového systému (man-PTS) (Bieler et al., 2006). Fosfotransferázový systém zabezpečuje import sacharidov do bakteriálnej bunky pričom dochádza k ich

fosforylácii. Okrem transportu sa podieľa aj na regulácii génovej expície a metabolizmu (*Saier, 2015). Man-PTS je zložený z dvoch častí. Cytoplazmatickú časť tvorí proteín ManX. Membránová časť je homotrimérna, pričom každý protomer pozostáva z dvoch proteínov, ManY a ManZ (Erni et al., 1987; Huang et al., 2021). ManYZ umožňujú inzerciu *mccE492* do membrány (Biéler et al., 2010). Kľúčovým prvkom *mccE492* je man-PTS doména, tvorená aminokyselinami (G52–P57) a (G63–S71), na Obrázku 4 vyznačená v červených rámečkoch. Man-PTS doména zabezpečuje prvotnú interakciu s ManYZ, v dôsledku čoho *mccE492* nadobúda špecifickú konformáciu. Táto konformácia je tvorená motívom helix-turn-helix, ktorý sa zanára do plazmatickej membrány. Jeden z α -helixov interaguje hydrofóbnymi interakciami s povrchom proteínov ManYZ (Obrázok 9), druhý nesie záporný náboj a predpokladá sa, že interaguje s kladne nabitými iónmi (Huang et al., 2021). Inzercia prvej molekuly *mccE492* do membrány pravdepodobne iniciuje asociáciu s ďalšími molekulami *mccE492*, pričom sa organizujú do kruhových pentamérnych štruktúr. Toto usporiadanie s najvyššou pravdepodobnosťou tvorí transmembránový pór v živých bunkách (Arranz et al., 2012). Takýto pór v membráne umožní pohyb iónov po ich elektrochemickom gradiente, čo vedie k depolarizácii bunky (Destoumieux-Garzón et al., 2003; Lagos et al., 1993). Mechanizmus samotného zostavenia póru však stále nie je objasnený. Otázne ostáva napríklad to, či musí každá molekula mikrocinu, podieľajúca na tvorbe pentaméru, interagovať s proteínmi ManYZ, alebo či je dostatočná interakcia prvej molekuly a následná oligomerizácia už prebieha bez tejto interakcie ako to bolo pozorované kryoelektrónovou mikroskopiou autormi Huang et al., (2021).



Obrázok 9 – *MccE492* sa vkladá do plazmatickej membrány vďaka interakcii s proteínmi ManXY. Vmotif a Core sú názvy domén proteínov Man XY. Červenou farbou je znázornená posttranslačná modifikácia na C-konci peptidu. Žltý trojuholník v štruktúre *mccE492* reprezentuje man-PTS väzobnú doménu, zvyšok peptidu tvoria dva α -helixy. Obrázok je prevzatý z práce Huang et al., (2021).

MccE492 nie je jediný bakteriocín, ktorý využíva man-PTS ako receptor. Bakteriocíny grampozitívnych baktérií z triedy II tiež využívajú man-PTS (Tymoszevska et al., 2018), avšak ich mechanizmus účinku nemusí byť tvorba póru v membráne (Maldonado-Barragán et al., 2013).

2.5 Transport mikrocínov

Bez toho aby sa mikrocíny ocitli v blízkosti svojich cieľových štruktúr nie je možné aby vykonávali svoju funkciu. Gramnegatívne baktérie sú chránené vnútornou a vonkajšou membránou (Bladen & Mergenhagen, 1964). Mikrocíny musia pri exporte prekonať obe membrány produkujúcej bunky, následne pri importe jednu alebo obe membrány cieľovej bunky. Pre tento pohyb mikrocíny využívajú transportéry, ktoré v bunke plnia iné úlohy, napríklad zabezpečujú prísun sideroforov (Destoumieux-Garzón et al., 2006). Bunková funkcia niektorých transportérov, napríklad importéru *mccC7*, ostáva stále neznáma (Ackroyd et al., 2024).

2.5.1 Export z produkujúcej bunky

Bakteriocíny sa z produkujúcej bunky môžu dostať buď cez špecifické exportné systémy zložené z viacerých proteínov alebo prostredníctvom lýzových proteínov, ktoré umožnia uvoľnenie nahromadených peptidov z cytoplazmy bunky. Ten druhý prípad je charakteristický pre väčšinu kolicínov (Cavard, 1991), ten prvý pre mikrocíny (Gilson et al., 1987). Export mikrocínov z produkujúcej bunky je zabezpečený ABC transportným systémom kódovaným priamo v génom klastri mikrocínov. Nevyhnutný je však aj chromozomálne kódovaný bakteriálny transportér vonkajšej membrány TolC (Garrido et al., 1988; Pons et al., 2004; Solbiati et al., 1999). ATP binding cassette (ABC) transportéry zabezpečujú pohyb molekúl cez plazmatickú membránu, buď v smere do bunky (importéry) alebo z bunky (exportéry). Prenášané molekuly sú rôzne, od esenciálnych metabolitov po xenobiotiká. ABC transportéry sa skladajú z transmembránovej domény (TMD), ktorá interaguje s prenášanou molekulou a domény viažucej nukleotidy (NBD), ktorá využíva energiu z hydrolýzy ATP k pohonu transportu substrátu (*Beis, 2015).

Z mikrocínov triedy II je najlepšie popísaný export *mccV*. CvaB, ABC exportér kódovaný v génom klastri *mccV*, obsahuje navyše k TMD a NBD aj peptidázovú doménu, preto sa nazýva „peptidase containing ABC transporter“. Peptidázová doména zabezpečuje odštiepenie 15 aminokyselín dlhej vedúcej sekvencie z N-konca peptidu (Gilson et al., 1990; Wu & Tai, 2004). Ako som už zmienil v kapitole o štruktúre (2.3.4), takúto vedúcu sekvenciu s motívom glycín-glycín obsahujú aj ostatné mikrocíny triedy II, ale aj niektoré bakteriocíny grampozitívnych baktérií, ktoré pre export využívajú tiež ABC exportéry s peptidázovou doménou (Havarstein et al., 1995; Van Belkum et al., 1997).

V génomovom klastri *mccV* je navyše k ABC transportéru kódovaný aj proteín membránovej fúzie „membrane fusion protein“. Tento proteín sprostredkuje prepojenie ABC transportéru na plazmatickej membráne a TolC, na vonkajšej membráne, čím je vytvorený kanál cez obe membrány. Jedná sa o verziu sekrečného systému typu I (Kim et al., 2023)

ABC exportné systémy mikrocínov triedy I neobsahujú peptidázovú doménu (Garrido et al., 1988; Gonzalez-Pastor et al., 1995; Husada et al., 2018). Na rozdiel od *mccV* sa v ich genetických klastroch nenachádza gén kódujúci proteín membránovej fúzie. Garrido et al., (1988) navrhli, že úlohu tohto proteínu môže nahrádzať iný, chromozomálne kódovaný bakteriálny proteín. Naopak Beis & Rebuffat, (2019) tvrdia, že môžu byť transportované najprv do periplazmatického priestoru a až následne cez vonkajšiu membránu. Ako by však bol v tomto prípade energizovaný transport cez TolC ostáva nejasné.

2.5.2 Import do cieľovej bunky

Import je dôležitým krokom pre fungovanie bakteriocínov. Prítomnosť či neprítomnosť receptorov alebo prenášačov rozhoduje o tom či je bakteriálna bunka citlivá k danému bakteriocínu alebo nie (*Braun et al., 2015). *MccB17* prekonáva vonkajšiu membránu cez *OmpF* (Lavina et al., 1986). *OmpF* je porín, nešpecifický transportný kanál, ktorý umožňuje pasívnu difúziu malých polárnych molekúl cez vonkajšiu membránu. Ako receptor a translokon ho okrem *mccB17* využívajú aj niektoré kolicíny (Yamashita et al., 2008). Všetky ostatné mikrocíny pre transport cez vonkajšiu membránu hostiteľskej bunky využívajú sideroforové receptory *FepA*, *FhuA*, *Fiu* a *Cir* (Chehade & Braun, 1988; Destoumieux-Garzón et al., 2005; Pons et al., 2004; Vassiliadis et al., 2010). Tento transport je energizovaný protonmotívnu silou prostredníctvom systému *TonB* (Destoumieux-Garzón et al., 2003; Li et al., 2021; Salomon & Farias, 1995).

Mikrocíny triedy II nevyžadujú transport cez plazmatickú membránu, interagujú s transmembránovými proteínmi. *MccE492* interaguje s *man-PTS* (Biéler et al., 2010), *mccH47* s ATP syntázou (Rodríguez & Laviña, 2003) a *mccV* s membránovým proteínom *SdsC*, ktorý bežne v bunke zabezpečuje transport serínu (Gérard et al., 2005). U ostatných mikrocínov skupiny II zatiaľ nebol popísaný mechanizmus interakcie s membránou hostiteľskej bunky. Mikrocíny triedy I musia byť naopak transportované cez plazmatickú membránu aby sa dostali k svojim intracelulárnym cieľom. *MccB17* a *mccJ25* využívajú proteín *SbmA* (Lavina et al., 1986; Salomon & Farias, 1995). Tento transportér je poháňaný protonotívnu silou a využívajú ho aj iné antimikróbne peptidy (Ghilarov et al., 2021). *MccC7* je transportovaný importným ABC transportérom *YejABEF*, zatiaľ s neznámou funkciou (Ackroyd et al., 2024).

2.6 Imunita a rezistencia proti mikrocínom

Existuje viacero mechanizmov, ktorými je zabezpečené, aby mikrocíny nezabili produkujúcu bunku. Prvým z nich, v prípade *mccJ25* aj jediným, je aktívny export z bunky (Solbiati et al., 1996). Druhým mechanizmom sú enzýmy, ktoré úpravou mikrocínu spôsobia jeho inaktiváciu. Ako príklad uvediem *mccC7*. *MccC7* je aktívny inhibítor aspartyl-tRNA syntetázy až po proteolytickej hydrolýze peptidovej časti, ku ktorej dochádza v hostiteľskej bunke. Avšak, môže sa stať, že táto maturácia nastane už v produkujúcej bunke (Severinov & Nair, 2012). V génovom klastri *mccC7* sú kódované dva imunitné proteíny. *MccE* je acetyltransferáza. Acetyluje α -amino skupinu maturovaného *mccC7*. Táto acetylácia bráni vzniku vhodnej väzby medzi mikrocínom a jeho cieľom, aspartyl-tRNA syntetázou (Agarwal et al., 2011). Druhý proteín, *MccF*, je serínová proteáza. Štiepy N-acylfosforamidovú väzbu (vyznačenú modrou šípkou na Obrázku 3) v maturovanom aj nematurovanom *mccC7*, čím ho deaktivuje (Agarwal et al., 2012).

Ďalším možným mechanizmom obrany produkujúcej bunky je interakcia imunitného proteínu s cieľovou štruktúrou mikrocínu. Proteín *McbG*, kódovaný v génovom klastri mikrocínu B17 zatiaľ neznámym mechanizmom interaguje s DNA gyrázou a chráni ju tým pred *mccB17* (Garrido et al., 1988). Tento proteín patrí do rodiny tzv. pentapeptide repeat proteins. Ich terciárna štruktúra je válcovitá a napodobňuje vlákno DNA. Viazu sa do DNA gyrázy namiesto vlákna DNA a znemožňujú tým aktivitu inhibítorov (Feng et al., 2021). Zároveň tým však samotné imunitné proteíny blokujú DNA gyrázu. Možným vysvetlením, prečo sú aj napriek tomu pre bunku výhodné je, že určité zníženie aktivity gyrázy dokážu bunky tolerovať, naopak už malé množstvo dvojvláknových zlomov spôsobené inhibítormi DNA gyrázy môže byť pre bunku smrteľné (Tran et al., 2005). Podobný mechanizmus, teda interakciu imunitného proteínu s cieľovou štruktúrou mikrocínu, nájdeme aj v prípade *mccE492*. Jeho imunitný proteín *MceB* je transmembránový proteín a predpokladá sa, že bráni oligomerizácii molekúl *mccE492* a tým bráni tvorbe póru (Huang et al., 2021). Čo sa týka ostatných mikrocínov triedy II, tiež si kódujú svoje imunitné proteíny. Podobne ako *MceB* obsahujú transmembránové domény, takže budú pravdepodobne tiež interagovať s membránou (Corsini et al., 2010; Pons et al., 2004; Vassiliadis et al., 2010). Viac sa však o týchto proteínoch povedať nedá, nakoľko zatiaľ neboli bližšie skúmané.

Okrem produkujúcich buniek, sa proti mikrocínom bránia aj cieľové bunky. Ako podotkli Baquero et al., (2019), v takom prípade už nehovoríme o imunite ale o rezistencii. Rezistencia je zabezpečená mutáciami v bunčných štruktúrach. Ako príklad uvediem *mccB17* a už spomínanú mutáciu tryptofánu na pozícii 751 v podjednotke DNA gyrázy (Del Castillo et al., 2001). Omnoho častejšou príčinou rezistencie sú však mutácie v transportných systémoch, napr. *FhuA*, *FepA* alebo *OmpF* (*Telhig et al., 2024). Rezistencia môže byť zabezpečená aj chromozomálne kódovanými ABC exportérmi ako to je v prípade *YojI*, ktorý z bunky exportuje *mccJ25* (Delgado et al., 2005).

Záver

V sedemdesiatych rokoch minulého storočia bola na základe malej molekulovej hmotnosti vytvorená skupina antimikróbnych peptidov izolovaných z enterobaktérií a nazvaných mikrocíny. Jedná sa o skupinu veľmi rozmanitú v mnohých aspektoch. Pri popise mikrocínov sa iba ťažko dajú ich vlastnosti zovšeobecniť tak aby platili pre celú skupinu, vždy sa nájde aspoň jeden mikrocín, ktorý sa v danom aspekte odlišuje od ostatných.

V tejto práci sú zhrnuté aktuálne poznatky o tom ako sú mikrocíny syntetizované, transportované, akým spôsobom je zabezpečená imunita a rezistencia bakteriálnych buniek a ako mikrocíny interagujú s ich cieľovými bunkovými štruktúrami. Moderné 3D zobrazovacie techniky umožnili detailne popísať fungovanie niektorých mikrocínov (Braffman et al., 2019), zatiaľ čo mechanizmy účinku iných zostávajú nejasné aj po desiatkach rokov štúdia. Veľmi zaujímavá je aktuálne aj ekologická úloha mikrocínov v prostredí (*Baquero et al., 2019) avšak tým som sa už v tejto práci nemal priestor bližšie zaoberať.

Aj napriek tomu, že bakteriocínom grampozitívnych baktérií sa vo výskume kladie väčšia pozornosť, stále sú publikované nové články aj o mikrocínoch. Tie sa prevažne zaoberajú možným využitím mikrocínov v praxi, najčastejšie v súvislosti so stúpajúcou rezistenciou baktérií proti antibiotikám (Mortzfeld et al., 2022). Diskutovaný je aj potenciál využitia mikrocínov v protinádorovej liečbe (Soudy et al., 2017; Varas et al., 2020).

Zoznam použitej literatúry:

* - sekundárny zdroj

- *Acedo, J. Z., Chiorean, S., Vederas, J. C., & van Belkum, M. J. (2018). The expanding structural variety among bacteriocins from Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 805–828.
- Ackroyd, B. K., Dodson, E. J., Mehboob, J., Dowle, A. A., Thomas, G. H., & Wilkinson, A. J. (2024). Structure and ligand binding in the putative anti-microbial peptide transporter protein, YejA. *Microbiology (United Kingdom)*, 170(2).
- Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J. T., Borukhov, S., Wang, M. D., & Severinov, K. (2004). Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Molecular Cell*, 14(6).
- Agarwal, V., Metlitskaya, A., Severinov, K., & Nair, S. K. (2011). Structural Basis for Microcin C7 Inactivation by the MccE Acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21295.
- Agarwal, V., Tikhonov, A., Metlitskaya, A., Severinov, K., & Nair, S. K. (2012). Structure and function of a serine carboxypeptidase adapted for degradation of the protein synthesis antibiotic microcin C7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4425–4430.
- *Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... van der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.*, 30(1), 108–160.
- Arranz, R., Mercado, G., Martín-Benito, J., Giraldo, R., Monasterio, O., Lagos, R., & Valpuesta, J. M. (2012). Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *Journal of Structural Biology*, 178(1), 54–60.
- Asensio, C., Pérez-Díaz, J. C., Martínez, M. C., & Baquero, F. (1976). A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 69(1), 7–14.
- Azpiroz, M. F., & Laviña, M. (2007). Modular Structure of Microcin H47 and Colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7), 2412–2419.
- *Banik, S. D., & Nandi, N. (2012). Chirality and Protein Biosynthesis. *Topics in Current Chemistry*, 333, 255–305.

- Bantysh, O., Serebryakova, M., Makarova, K. S., Dubiley, S., Datsenko, K. A., & Severinov, K. (2014). Enzymatic synthesis of bioinformatically predicted microcin C-like compounds encoded by diverse bacteria. *MBio*, 5(3).
- *Baquero, F., Beis, K., Craik, D. J., Li, Y., Link, A. J., Rebuffat, S., Salomón, R., Severinov, K., Zirah, S., & Hegemann, J. D. (2024). The pearl jubilee of microcin J25: thirty years of research on an exceptional lasso peptide. *Natural Product Reports*, 41(3), 469–511.
- *Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M. R., del Campo, R., & Bravo-Vázquez, D. A. (2019). Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Frontiers in Microbiology*, 10, 473968.
- *Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893.
- *Beis, K., & Rebuffat, S. (2019). Multifaceted ABC transporters associated to microcin and bacteriocin export. *Research in Microbiology*, 170(8), 399–406.
- Bellomio, A., Vincent, P. A., De Arcuri, B. F., Farias, R. N., & Morero, R. D. (2007). Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in Escherichia coli: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *Journal of Bacteriology*, 189(11), 4180–4186.
- Berg, P., & Offengand, E. J. (1958). An Enzymatic Mechanism for Linking Amino Acids to RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(2), 78–86.
- Bernier, S., Akochy, P. M., Lapointe, J., & Chênevert, R. (2005). Synthesis and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitory activity of aspartyl adenylate analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(1), 69–75.
- Biéler, S., Silva, F., & Belin, D. (2010). The polypeptide core of Microcin E492 stably associates with the mannose permease and interferes with mannose metabolism. *Research in Microbiology*, 161(8), 706–710.
- Bieler, S., Silva, F., Soto, C., & Belin, D. (2006). Bactericidal Activity of both Secreted and Nonsecreted Microcin E492 Requires the Mannose Permease. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7049.
- Bladen, H. A., & Mergenhagen, S. E. (1964). Ultrastructure of veillonella and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. *Journal of Bacteriology*, 88(5), 1482–1492.
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M. J., Barthélémy, M., Prigent, Y., Salomón, R. A., Farias, R. N., Moreno, F., & Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from Escherichia coli. *European Journal of Biochemistry*, 259(3), 747–756.

- *Borisov, V. B., & Verkhovsky, M. I. (2015). Oxygen as Acceptor. *EcoSal Plus*, 6(2).
- Bosák, J., Laiblová, P., Šmarda, J., Dědičová, D., & Šmajš, D. (2012). Novel colicin FY of *Yersinia frederiksenii* inhibits pathogenic *Yersinia* strains via YiuR-mediated reception, TonB import, and cell membrane pore formation. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 1950–1959.
- Braffman, N. R., Piscotta, F. J., Hauver, J., Campbell, E. A., James Link, A., & Darst, S. A. (2019). Structural mechanism of transcription inhibition by lasso peptides microcin J25 and capistrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(4).
- *Braun, V., Helbig, S., Patzer, S. I., Pramanik, A., & Römer, C. (2015). Import and export of bacterial protein toxins. *International Journal of Medical Microbiology*, 305(2), 238–242.
- *Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. *Molecules*, 25(23).
- *Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., & Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(1), 158–229.
- Cavard, D. (1991). Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: comparison with the colicin A lysis protein. *Journal of Bacteriology*, 173(1), 191–196.
- Chan, P. F., Germe, T., Bax, B. D., Huang, J., Thalji, R. K., Bacqué, E., Checchia, A., Chen, D., Cui, H., Ding, X., Ingraham, K., McCloskey, L., Raha, K., Srikannathasan, V., Maxwell, A., & Stavenger, R. A. (2017). Thiophene antibacterials that allosterically stabilize DNA-cleavage complexes with DNA gyrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(22), E4492–E4500.
- Chandra Ojha, S., Imtong, C., Meetur, K., Sakdee, S., Katzenmeier, G., & Angsuthanasombat, C. (2018). Purification and characterization of the antibacterial peptidase lysostaphin from *Staphylococcus simulans*: Adverse influence of Zn²⁺ on bacteriolytic activity. *Protein Expression and Purification*, 151, 106–112.
- Chegade, H., & Braun, V. (1988). Iron-regulated synthesis and uptake of colicin V. *FEMS Microbiology Letters*, 52(3), 177–181.
- Chico, C. H., San Millán, J. L., Kolter, R., & Moreno, F. (1986). Growth Phase and OmpR Regulation of Transcription of Microcin B17 Genes. *Journal of Bacteriology*, 167(3), 1058–1065.
- *Cole, T. J., Parker, J. K., Feller, A. L., Wilke, C. O., & Davies, B. W. (2022). Evidence for Widespread Class II Microcins in Enterobacterales Genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(23), 23.

- *Collin, F., & Maxwell, A. (2019). The Microbial Toxin Microcin B17: Prospects for the Development of New Antibacterial Agents. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 18, pp. 3400–3426). Academic Press.
- Corsini, G., Baeza, M., Monasterio, O., & Lagos, R. (2002). The expression of genes involved in microcin maturation regulates the production of active microcin E492. *Biochemie*, *84*(5–6), 539–544.
- Corsini, G., Karahanian, E., Tello, M., Fernandez, K., Rivero, D., Saavedra, J. M., & Ferrer, A. (2010). Purification and characterization of the antimicrobial peptide microcin N. *FEMS Microbiology Letters*, *312*(2), 119–125.
- Davagnino, J., Herrero, M., Furlong, D., Moreno, F., & Kolter, R. (1986). The DNA replication inhibitor microcin B17 is a forty-three-amino-acid protein containing sixty percent glycine. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *1*(3), 230–238.
- Davies, J. K., & Reeves, P. (1975a). Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group A. *Journal of Bacteriology*, *123*(1).
- Davies, J. K., & Reeves, P. (1975b). Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group B. *Journal of Bacteriology*, *123*(1), 96–101.
- de Lorenzo, V. (1984). Isolation and characterization of microcin E 492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology*, *139*(1), 72–75.
- Del Castillo, F. J., Del Castillo, I., & Moreno, F. (2001). Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* *gyrB* gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin B17 and alter the activity of DNA gyrase. *Journal of Bacteriology*, *183*(6), 2137–2140.
- Delgado, M. A., Vincent, P. A., Farías, R. N., & Salomón, R. A. (2005). YojI of *Escherichia coli* Functions as a Microcin J25 Efflux Pump. *Journal of Bacteriology*, *187*(10), 3465–3470.
- Destoumieux-Garzón, D., Duquesne, S., Peduzzi, J., Goulard, C., Desmadril, M., Letellier, L., Rebuffat, S., & Boulanger, P. (2005). The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochemical Journal*, *389*(3), 869–876.
- Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Thomas, X., Djediat, C., & Rebuffat, S. (2006). Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *BioMetals*, *19*(2), 181–191.
- Destoumieux-Garzón, D., Thomas, X., Santamaria, M., Goulard, C., Barthélémy, M., Boscher, B., Bessin, Y., Molle, G., Pons, A. M., Letellier, L., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2003). Microcin E492

- antibacterial activity: Evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 49(4), 1031–1041.
- DeWitt, W., & Helinski, D. R. (1965). Characterization of colicinogenic factor E1 from a non-induced and a mitomycin C-induced *Proteus* strain. *Journal of Molecular Biology*, 13(3), 692–703.
- Dong, S. H., Kulikovskiy, A., Zukher, I., Estrada, P., Dubiley, S., Severinov, K., & Nair, S. K. (2019). Biosynthesis of the RiPP trojan horse nucleotide antibiotic microcin C is directed by the N-formyl of the peptide precursor. *Chemical Science*, 10(8), 2391–2395.
- *Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., & Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. In *Natural Product Reports* (Vol. 24, Issue 4, pp. 708–734).
- Eduardo Gonza, J., San Milla, J. L., Castilla, N., & Moreno, F. (1995). Structure and Organization of Plasmid Genes Required To Produce the Translation Inhibitor Microcin C7. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7131–7140.
- El Ghachi, M., Bouhss, A., Barretheau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D., & Mengin-Lecreulx, D. (2006). Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), 22761–22772.
- Elfarash, A., Dingemans, J., Ye, L., Hassan, A. A., Craggs, M., Reimann, C., Thomas, M. S., & Cornelis, P. (2014). Pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to kill *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 2), 261–269.
- Elfarash, A., Wei, Q., & Cornelis, P. (2012). The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 268–275.
- Erni, B., Zanolari, B., & Kocher, H. P. (1987). The mannose permease of *Escherichia coli* consists of three different proteins. Amino acid sequence and function in sugar transport, sugar phosphorylation, and penetration of phage lambda DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 262(11), 5238–5247.
- Esyunina, D., Agapov, A., & Kulbachinskiy, A. (2016). Regulation of transcriptional pausing through the secondary channel of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(31), 8699–8704.
- Feng, L., Mundy, J. E. A., Stevenson, C. E. M., Mitchenall, L. A., Lawson, D. M., Mi, K., & Maxwell, A. (2021). The pentapeptide-repeat protein, MfpA, interacts with mycobacterial DNA gyrase as a DNA T-segment mimic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(11).

- Fomenko, D. E., Metlitskaya, A. Z., Péduzzi, J., Goulard, C., Katrukha, G. S., Gening, L. V., Rebuffat, S., & Khmel, I. A. (2003). Microcin C51 plasmid genes: possible source of horizontal gene transfer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(9), 2868–2874.
- Fuller, A. T., & Horton, J. M. (1950). Marcescin, an antibiotic substance from *Serratia marcescens*. *Journal of General Microbiology*, *4*(3), 417–433.
- Gagliano, V. J., & Hinsdill, R. D. (1970). Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, *104*(1), 117–125.
- Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gür, D., Jarlier, V., Kahlmeter, G., Monen, J., Monnet, D. L., Rossolini, G. M., Suetens, C., Weist, K., Heuer, O., Apfalter, P., El Belazi, G., Fluch, G., Hain, C., Hrabcik, H., ... Wilson, J. (2011). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS), 2002 to 2009. *Eurosurveillance*, *16*(11), 19819.
- Gaillard-Gendron, S., Vignon, D., Cottenceau, G., Graber, M., Zorn, N., van Dorsselaer, A., & Pons, A.-M. (2000). Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, *193*(1), 95–98.
- Galván, A. E., Chalón, M. C., Ríos Colombo, N. S., Schurig-Briccio, L. A., Sosa-Padilla, B., Gennis, R. B., & Bellomio, A. (2019). Microcin J25 inhibits ubiquinol oxidase activity of purified cytochrome bd-I from *Escherichia coli*. *Biochimie*, *160*.
- Gardner, P. R., Raineri, I., Epstein, L. B., & White, C. W. (1995). Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(22), 13399–13405.
- Gargis, S. R., Heath, H. E., Heath, L. S., LeBlanc, P. A., Simmonds, R. S., Abbott, B. D., Timkovich, R., & Sloan, G. L. (2009). Use of 4-sulfophenyl isothiocyanate labeling and mass spectrometry to determine the site of action of the streptococcolytic peptidoglycan hydrolase zoocin A. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(1), 72–77.
- Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R., & Moreno, F. (1988). The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *The EMBO Journal*, *7*(6), 1853.
- Ge, P., Scholl, D., Leiman, P. G., Yu, X., Miller, J. F., & Zhou, Z. H. (2015). Atomic structures of a bactericidal contractile nanotube in its pre- and postcontraction states. *Nature Structural and Molecular Biology*, *22*(5), 377–382.
- Gérard, F., Pradel, N., & Wu, L.-F. (2005). Bactericidal Activity of Colicin V Is Mediated by an Inner Membrane Protein, SdaC, of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(6), 1945–1950.

- Ghilarov, D., Inaba-Inoue, S., Stepien, P., Qu, F., Michalczyk, E., Pakosz, Z., Nomura, N., Ogasawara, S., Charles Walker, G., Rebuffat, S., Iwata, S., Gardiner Heddle, J., & Beis, K. (2021). Molecular mechanism of SbmA, a promiscuous transporter exploited by antimicrobial peptides. *Science Advances*, 7(37).
- Gilson, L., Mahanty, H. K., & Kolter, R. (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *Journal of Bacteriology*, 169(6), 2466.
- Gilson, L., Mahanty, K., & Kolter, R. (1990). Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *The EMBO Journal*, 9(12), 3875–3884.
- González-Flecha, B., & Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(23), 13681–13687.
- Gonzalez-Pastor, J. E., San Millan, J. L., Castilla, M. A., & Moreno, F. (1995). Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7131.
- González-Pastor, J. E., San Millán, J. L., & Moreno, F. (1994). The smallest known gene. *Nature*, 369(6478), 281.
- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, 93, 1040–1042.
- Gubaev, A., & Klostermeier, D. (2014). The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA Repair*, 16(1), 23–34.
- Guijarro, J. I., González-Pastor, J. E., Baleux, F., San Millán, J. L., Castilla, M. A., Rico, M., Moreno, F., & Delepierre, M. (1995). Chemical Structure and Translation Inhibition Studies of the Antibiotic Microcin C7. *Journal of Biological Chemistry*, 270(40), 23520–23532.
- Han, Y., Li, Y., Zeng, Z., Li, W., Feng, S., & Cao, W. (2022). Resistance Mechanism and Physiological Effects of Microcin Y in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium. *Microbiology Spectrum*, 10(6).
- *Hansen, J. N. (1993). Antibiotics synthesized by posttranslational modification. *Annual Review of Microbiology*, 47, 535–564.
- Havarstein, L. S., Diep, D. B., & Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular Microbiology*, 16(2), 229–240.

- Heddle, J. G., Blance, S. J., Zamble, D. B., Hollfelder, F., Miller, D. A., Wentzell, L. M., Walsh, C. T., & Maxwell, A. (2001). The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: Characterisation of the mode of inhibition. *Journal of Molecular Biology*, *307*(5), 1223–1234.
- Herrero, M., & Moreno, F. (1986). Microcin B17 Blocks DNA Replication and Induces the SOS System in *Escherichia coli*. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 132).
- *Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 582779.
- Huang, K., Zeng, J., Liu, X., Jiang, T., & Wang, J. (2021). Structure of the mannose phosphotransferase system (man-PTS) complexed with microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Cell Discovery* *2021 7:1*, *7*(1), 1–5.
- Husada, F., Bountra, K., Tassis, K., de Boer, M., Romano, M., Rebuffat, S., Beis, K., & Cordes, T. (2018). Conformational dynamics of the ABC transporter McjD seen by single-molecule FRET. *The EMBO Journal*, *37*(21).
- Imlay, J. A., Chin, S. M., & Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science (New York, N.Y.)*, *240*(4852), 640–642.
- *Islam, M. R., Nagao, J. I., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2012). Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochemical Society Transactions*, *40*(6), 1528–1533.
- Jacob, F. (1954). Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine, antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea* [Induced biosynthesis and mode of action of a pyocine, antibiotic produced by *Pseudomonas aeruginosa*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, *86*(2), 149–160.
- Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A., & Wollman, E. (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie [Definition of some terms relative to lysogeny]. *Annales de l'Institut Pasteur*, *84*(1), 222–224.
- Joerger, M. C., & Klaenhammer, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, *167*(2), 439–446.
- Khan, H., Flint, S. H., & Yu, P. L. (2013). Determination of the mode of action of enterolysin A, produced by *Enterococcus faecalis* B9510. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(2), 484–494.
- Kim, S. Y., Parker, J. K., Gonzalez-Magaldi, M., Telford, M. S., Leahy, D. J., & Davies, B. W. (2023). Export of Diverse and Bioactive Small Proteins through a Type I Secretion System. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(5).

- Kimura, K. I., Kanou, F., Takahashi, H., Esumi, Y., Uramoto, M., & Yoshihama, M. (1997). Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*, *50*(5), 373–378.
- Kuroda, K., & Kageyama, M. (1979). Biochemical properties of a new flexuous bacteriocin, pyocin F1, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biochemistry*, *85*(1), 7–19.
- Lagos, R., Baeza, M., Corsini, G., Hetz, C., Strahsburger, E., Castillo, J. A., Vergara, C., & Monasterio, O. (2001). Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Molecular Microbiology*, *42*(1), 229–243.
- Lagos, R., Wilkens, M., Vergara, C., Cecchi, X., & Monasterio, O. (1993). Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membranes. *FEBS Letters*, *321*(2–3), 145–148.
- Lavina, M., Pugsley, A. P., & Moreno, F. (1986). Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology*, *132*(6), 1685–1693.
- Lee, G., Chakraborty, U., Gebhart, D., Govoni, G. R., Zhou, Z. H., & Scholl, D. (2016). F-type bacteriocins of *Listeria monocytogenes*: A new class of phage tail-like structures reveals broad parallel coevolution between tailed bacteriophages and high-molecular-weight bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, *198*(20), 2784–2793.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzi, S., Burley, S. K., Almo, S. C., & Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(11), 4154–4159.
- Li, Y.-M., Han, Y., Zeng, Z., Li, W., Feng, S., & Cao, W. (2021). Discovery and Bioactivity of the Novel Lasso Peptide Microcin y. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(31), 8758–8767.
- Li, Y.-M., Milne, J., Madison, L., Kolter, R., & Walsh, C. (1996). From Peptide Precursors to Oxazole and Thiazole-Containing Peptide Antibiotics: Microcin B17 Synthase. *Science (New York, N.Y.)*, *274*, 1188–1193.
- Ma, Y., Fu, W., Hong, B., Wang, X., Jiang, S., & Wang, J. (2023). Antibacterial MccM as the Major Microcin in *Escherichia coli* Nissle 1917 against Pathogenic Enterobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(14).
- Madison, L. L., Vivas, E. I., Li, Y. M., Walsh, C. T., & Kolter, R. (1997). The leader peptide is essential for the post-translational modification of the DNA-gyrase inhibitor microcin B17. *Molecular Microbiology*, *23*(1), 161–168.

- Maldonado-Barragán, A., Cárdenas, N., Martínez, B., Ruiz-Barba, J. L., Fernández-Garayzábal, J. F., Rodríguez, J. M., & Gibello, A. (2013). Garvicin A, a novel class IId bacteriocin from *Lactococcus garvieae* that inhibits septum formation in *L. garvieae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(14), 4336–4346.
- *Massip, C., & Oswald, E. (2020). Siderophore-Microcins in *Escherichia coli*: Determinants of Digestive Colonization, the First Step Toward Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 548014.
- Mattick, A. , & Hirsch, A. (1944). A Powerful Inhibitory Substance Produced by Group N Streptococci. *Nature* , *154*, 551–551.
- Mazumder, A., Lin, M., Kapanidis, A. N., & Ebright, R. H. (2020). Closing and opening of the RNA polymerase trigger loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(27), 15642–15649.
- *Menninger, J. R. (1995). Mechanism of inhibition of protein synthesis by macrolide and lincosamide antibiotics. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *6*(3–4).
- Metlev, M., Arseniev, A., Bushin, L. B., Kuznedelov, K., Artamonova, T. O., Kondratenko, R., Khodorkovskii, M., Seyedsayamdest, M. R., & Severinov, K. (2017). Acinetodin and Klebsidin, RNA Polymerase Targeting Lasso Peptides Produced by Human Isolates of *Acinetobacter gyllenbergii* and *Klebsiella pneumoniae*. *ACS Chemical Biology*, *12*(3), 814–824.
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashennikov, I., Kolb, V., Khmel, I., & Severinov, K. (2006). Aspartyl-tRNA Synthetase Is the Target of Peptide Nucleotide Antibiotic Microcin C. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 18033–18042.
- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Vondenhoff, G. H., Novikova, M., Shashkov, A., Zatsepin, T., Semenova, E., Zaitseva, N., Ramensky, V., Aerschot, A. Van, & Severinov, K. (2009). Maturation of the Translation Inhibitor Microcin C. *Journal of Bacteriology*, *191*(7), 2380–2387.
- Micenková, L., Bosák, J., Kucera, J., Hrala, M., Dolejšová, T., Šedo, O., Linke, D., Fišer, R., & Šmajš, D. (2019). Colicin Z, a structurally and functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Scientific Reports 2019 9:1*, *9*(1), 1–12.
- Michalczyk, E., Hommernick, K., Behroz, I., Kulike, M., Pakosz-Stępień, Z., Mazurek, L., Seidel, M., Kunert, M., Santos, K., von Moeller, H., Loll, B., Weston, J. B., Mainz, A., Heddle, J. G., Süßmuth, R. D., & Ghilarov, D. (2023). Molecular mechanism of topoisomerase poisoning by the peptide antibiotic albicidin. *Nature Catalysis*, *6*(1), 52–67.

- Morin, N., Laneluc, I., Connil, N., Cottenceau, M., Pons, A. M., & Sablé, S. (2011). Mechanism of Bactericidal Activity of Microcin L in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(3), 997–1007.
- Mortzfeld, B. M., Palmer, J. D., Bhattarai, S. K., Dupre, H. L., Mercado-Lubio, R., Silby, M. W., Bang, C., McCormick, B. A., & Bucci, V. (2022). Microcin MccI47 selectively inhibits enteric bacteria and reduces carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in vivo when administered via an engineered live biotherapeutic. *Gut Microbes*, *14*(1).
- Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R. M., & Ebright, R. H. (2004). Antibacterial Peptide Microcin J25 Inhibits Transcription by Binding within and Obstructing the RNA Polymerase Secondary Channel mechanism for inhibition of a nucleotide polymerase and an attractive target for antibacterial drug discovery. In *Molecular Cell* (Vol. 14).
- Müller, E., & Radler, F. (1993). Caseicin, a bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Folia Microbiologica*, *38*(6), 441–446.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E., & Sato, K. (1991). Membrane damage due to lipid oxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(1), 201S-205S.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L. S., Sletten, K., & Nes, I. F. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, *174*(17), 5686–5692.
- Nolan, E. M., Fischbach, M. A., Koglin, A., & Walsh, C. T. (2007). Biosynthetic tailoring of microcin E492m: Post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(46), 14336–14347.
- *Parker, J. K., & Davies, B. W. (2022). Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development. *Microbiology (United Kingdom)*, *168*(4), 001175.
- Parker, M. W., Pattus, F., Tucker, A. D., & Tsernoglou, D. (1989). Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* *1989 337:6202*, *337*(6202), 93–96.
- Parks, W. M., Bottrill, A. R., Pierrat, O. A., Durrant, M. C., & Maxwell, A. (2007). The action of the bacterial toxin, microcin B17, on DNA gyrase. *Biochimie*, *89*(4), 500–507.
- Paz-Yepes, J., Brahamsha, B., & Palenik, B. (2013). Role of a Microcin-C-like biosynthetic gene cluster in allelopathic interactions in marine *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 12030–12035.

- Pierrat, O. A., & Maxwell, A. (2003). The action of the bacterial toxin microcin B17: Insight into the cleavage-religation reaction of DNA gyrase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35016–35023.
- Pierrat, O. A., & Maxwell, A. (2005). Evidence for the role of DNA strand passage in the mechanism of action of microcin B17 on DNA gyrase. *Biochemistry*, 44(11), 4204–4215.
- Pollack, J. R., & Neilands, J. B. (1970). Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 38(5), 989–992.
- Pons, A. M., Delalande, F., Duarte, M., Benoit, S., Lanneluc, I., Sablé, S., Van Dorsselaer, A., & Cottenceau, G. (2004). Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 505.
- Rakin, A., Boolgakowa, E., & Heesemann, J. (1996). Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster. *Microbiology*, 142(12), 3415–3424.
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–13.
- *Reece, R. J., Maxwell, A., & Wang, J. C. (1991). DNA Gyrase: Structure and Function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(4), 335–375.
- Regni, C. A., Roush, R. F., Miller, D. J., Nourse, A., Walsh, C. T., & Schulman, B. A. (2009). How the MccB bacterial ancestor of ubiquitin E1 initiates biosynthesis of the microcin C7 antibiotic. *EMBO Journal*, 28(13), 1953–1964.
- Riley, M. A., Pinou, T., Wertz, J. E., Tan, Y., & Valletta, C. M. (2001). Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid*, 45(3), 209–221.
- Rodríguez, E., & Laviña, M. (2003). The Proton Channel Is the Minimal Structure of ATP Synthase Necessary and Sufficient for Microcin H47 Antibiotic Action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 181–187.
- Roos, U., Harkness, R. E., & Braun, V. (1989). Assembly of colicin genes from a few DNA fragments. Nucleotide sequence of colicin D. *Molecular Microbiology*, 3(7), 891–902.
- Rosendahl, G., & Douthwaite, S. (1994). The antibiotics micrococin and thiostrepton interact directly with 23S rRNA nucleotides 1067A and 1095A. *Nucleic Acids Research*, 22(3), 357–363.
- Roush, R. F., Nolan, E. M., Löhr, F., & Walsh, C. T. (2008). Maturation of an *Escherichia coli* Ribosomal Peptide Antibiotic by ATP-Consuming N–P Bond Formation in Microcin C7. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), 6055.

- *Roy, R. S., Gehring, A. M., Milne, J. C., Belshaw, P. J., & Walsh, C. T. (1999). Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Natural Product Reports*, *16*(2), 249–263.
- *Saier, M. H. (2015). The Bacterial Phosphotransferase System: New frontiers 50 years after its discovery. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *25*(0), 73.
- Salomon, R. A., & Farias, R. N. (1995). The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *Journal of Bacteriology*, *177*(11), 3323–3325.
- San Millan, J. L., Kolter, R., & Moreno, F. (1985). Plasmid Genes Required for Microcin B17 Production. *Journal of Bacteriology*, *163*(3), 1016–1020.
- Schaller, K., & Nomura, M. (1976). Colicin E2 is DNA endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *73*(11), 3989–3993.
- Serebryakova, M., Tsibulskaya, D., Mokina, O., Kulikovskiy, A., Nautiyal, M., Van Aerschot, A., Severinov, K., & Dubiley, S. (2016). A Trojan-Horse Peptide-Carboxymethyl-Cytidine Antibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(48), 15690–15698.
- Severinov, K., & Nair, S. K. (2012). Microcin C: biosynthesis and mechanisms of bacterial resistance. *Future Microbiology*, *7*(2), 281–289.
- Shaevitz, J. W., Abbondanzieri, E. A., Landick, R., & Block, S. M. (2003). Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution *Escherichia coli* RNA polymerase (RNAP) synthesizes RNA with remarkable fidelity in vivo. *Nature*, *426*, 684–687.
- Shang, L., Yu, H., Liu, H., Chen, M., Zeng, X., & Qiao, S. (2021). Recombinant antimicrobial peptide microcin J25 alleviates DSS-induced colitis via regulating intestinal barrier function and modifying gut microbiota. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *139*(7).
- *Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 5).
- Sinha Roy, R., Kelleher, N. L., Milne, J. C., & Walsh, C. T. (1998). In vivo processing and antibiotic activity of microcin B17 analogs with varying ring content and altered bisheterocyclic sites. *Chem. Biol*, 305–318.
- Šmajš, D., Pilsł, H., & Braun, V. (1997). Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of Bacteriology*, *179*(15), 4919–4928.
- Šmajš, D., & Weinstock, G. M. (2001). Genetic organization of plasmid ColJs, encoding colicin Js activity, immunity, and release genes. *Journal of Bacteriology*, *183*(13), 3949–3957.

- Šmarda, J., & Benada, O. (2005). Phage tail-like (high-molecular-weight) bacteriocins of *Budvicia aquatica* and *Pragia fontium* (Enterobacteriaceae). *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8970–8973.
- Sobota, J. M., & Imlay, J. A. (2011). Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(13), 5402–5407.
- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Fari'as, R. N., Fari'as, F., Rau', R., Salomo'n, R. A., & Salomo'n, S. (1996). Genetic Analysis of Plasmid Determinants for Microcin J25 Production and Immunity. *Journal of Bacteriology*, *178*(12), 3661–3663.
- Solbiati, J. O., Ciaccio, M., Fari'as, R. N., González-Pastor, J. E., Moreno, F., & Salomón, R. A. (1999). Sequence Analysis of the Four Plasmid Genes Required To Produce the Circular Peptide Antibiotic Microcin J25. *Journal of Bacteriology*, *181*(8), 2659–2662.
- Soudy, R., Etayash, H., Bahadorani, K., Lavasanifar, A., & Kaur, K. (2017). Breast Cancer Targeting Peptide Binds Keratin 1: A New Molecular Marker for Targeted Drug Delivery to Breast Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, *14*(3), 593–604.
- Suarez, G., & Nathans, D. (1965). Inhibition of aminoacyl-sRNA binding to ribosomes by tetracycline. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *18*(5–6), 743–750.
- Swe, P. M., Cook, G. M., Tagg, J. R., & Jack, R. W. (2009). Mode of action of dysgalactin: a large heat-labile bacteriocin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(4), 679–686.
- *Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, *40*(3), 722–756.
- Takeda, Y., & Kageyama, M. (1975). Subunit arrangement in the extended sheath of pyocin R. *Journal of Biochemistry*, *77*(3), 679–684.
- Tan, S., Ludwig, K. C., Müller, A., Schneider, T., & Nodwell, J. R. (2019). The Lasso Peptide Siamycin-I Targets Lipid II at the Gram-Positive Cell Surface. *ACS Chemical Biology*, *14*(5), 966–974.
- *Telhig, S., Pham, N. P., Said, L. Ben, Rebuffat, S., Ouellette, M., Zirah, S., & Fliss, I. (2024). Exploring the genetic basis of natural resistance to microcins. *Microbial Genomics*, *10*(2).
- Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005). Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(1), 118–125.

- Tymoszewska, A., Diep, D. B., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2018). The extracellular loop of Man-PTS subunit IID is responsible for the sensitivity of *Lactococcus garvieae* to garvicins A, B and C. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–15.
- Upreti, G. C., & Hinsdill, R. D. (1975). Production and Mode of Action of Lactocin 27: Bacteriocin from a Homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7(2), 139–145.
- Van Belkum, M. J., Worobo, R. W., & Stiles, M. E. (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 23(6), 1293–1301.
- Vanden Broeck, A., Lotz, C., Ortiz, J., & Lamour, V. (2019). Cryo-EM structure of the complete *E. coli* DNA gyrase nucleoprotein complex. *Nature Communications*, 10(1).
- Varas, M. A., Muñoz-Montecinos, C., Kallens, V., Simon, V., Allende, M. L., Marcoleta, A. E., & Lagos, R. (2020). Exploiting Zebrafish Xenografts for Testing the in vivo Antitumorigenic Activity of Microcin E492 Against Human Colorectal Cancer Cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, 492896.
- Varenne, S., Cavard, D., & Lazdunski, C. (1981). Biosynthesis and Export of Colicin A in *Citrobacter freundii* CA31. *European Journal of Biochemistry*, 116(3), 615–620.
- Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., & Peduzzi, J. (2010). Isolation and Characterization of Two Members of the Siderophore-Microcin Family, Microcins M and H47. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 288.
- *Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., & Peduzzi, J. (2011). Class II Microcins. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, 309–332.
- Vestergaard, M., Berglund, N. A., Hsu, P. C., Song, C., Koldsø, H., Schiøtt, B., & Sansom, M. S. P. (2019). Structure and Dynamics of Cinnamycin-Lipid Complexes: Mechanisms of Selectivity for Phosphatidylethanolamine Lipids. *ACS Omega*, 4(20), 18889–18899.
- Vizán JL, Hernández-Chico C, Del Castillo I, & Moreno F. (1991). The peptide antibiotic microcin B17 induces double-strand cleavage of DNA mediated by *E. coli* DNA gyrase. *The EMBO Journal*, 10(2), 467–476.
- Waksman, S. A. (1947). What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance. *Mycologia*, 39(5), 565–569.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093.
- Wiedemann, I., Breukink, E., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., De Kruijff, B., & Sahl, H. G. (2001). Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore

- Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1772–1779.
- Wilson, K.-A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B. T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., & Darst, S. A. (2003). Structure of Microcin J25, a Peptide Inhibitor of Bacterial RNA Polymerase, is a Lassoed Tail. *Journal of the American Chemical Society*, 125(41), 12475–12483.
- Wu, K. H., & Tai, P. C. (2004). Cys32 and His105 are the critical residues for the calcium-dependent cysteine proteolytic activity of CvaB, an ATP-binding cassette transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 901–909.
- Yamashita, E., Zhalnina, M. V., Zakharov, S. D., Sharma, O., & Cramer, W. A. (2008). Crystal structures of the OmpF porin: function in a colicin translocon. *The EMBO Journal*, 27(15), 2171–2180.
- Yan, K. P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T. A., Marahiel, M. A., & Rebuffat, S. (2012). Dissecting the Maturation Steps of the Lasso Peptide Microcin J25 in vitro. *ChemBioChem*, 13(7), 1046–1052.
- Yorgey, P., Davagnino, J., & Kolter, R. (1993). The maturation pathway of microcin B17, a peptide inhibitor of DNA gyrase. *Molecular Microbiology*, 9(4), 897–905.
- *Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., & Noskova, S. (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(9), 1–21.
- Zschüttig, A., Zimmermann, K., Blom, J., Goesmann, A., Pöhlmann, C., & Gunzer, F. (2012). Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *PLOS ONE*, 7(3), e33351.

knihy:

- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). W.H. Freeman.