

Gyraza będąca bakteryjną topoizomerazą II jest enzymem niezbędnym do zmiany topologii DNA podczas procesów replikacji i transkrypcji. Heterotetramer gyrazy składa się z dwóch podjednostek GyrA i dwóch podjednostek GyrB. Enzym jest wyjątkowy, ponieważ jako jedyna topoizomeraza jest w stanie generować ujemnie superskręty DNA. Gyraza jest atrakcyjnym celem dla antybiotyków ze względu na fakt, że podczas cyklu reakcji enzym musi przejść przez etap pośredni, w którym DNA jest przecięte na obu niciach. Antybiotyki hamujące ligację przeciętych nici powodują nagromadzenie dwuniciowych przerw w DNA komórkowym, które są letalne dla komórki. Antybiotyki, których molekularnym celem jest gyraza, wiążą się do różnych miejsc enzymu. Przykładem takich klinicznie istotnych antybiotyków są fluorochinolony, wprowadzone do użytku w połowie lat 80. Niestety oporność na fluorochinolony stała się powszechna. Mutacje odpowiedzialne za obniżenie wiązania fluorochinolonów do gyrazy DNA zostały szeroko opisane.

W ciągu ostatnich 15 lat pojawiła się również plazmidowo przenoszona oporność na fluorochinolony. Najpopularniejszy gen *qnr* koduje białko zawierające motyw powtórzeń pentapeptydowych (PRP). Plazmid *qnr* zapewnia jedynie umiarkowany poziom ochrony przed działaniem fluorochinolonów. Jednak częściowa oporność umożliwia rozwój pełnej oporności dzięki nabyciu dodatkowych mutacji chromosomalnych lub pomp błonowych.

Istnieją trzy podstawowe modele białek PRP oddziałujących z gyrazą DNA. Po rozwiązaniu pierwszej struktury białka PRP oddziałującego z topoizomerazą MfpA z *Mycobacterium tuberculosis* zasugerowano, że MfpA konkuruje z dwuniciowym DNA o wiązanie się z regionem enzymu, w którym dochodzi do rozcinania i ligacji DNA. W tym modelu białka PRP naśladują segment G DNA i wiążą się z miejscem wiązania segmentu G w podjednostce GyrA. Zaproponowano również inny mechanizm wyjaśniający w jaki sposób białka PRP dają ochronę przed działaniem fluorochinolonów bez wpływu na superskręcanie, które byłoby obserwowane w pierwszym modelu na skutek kompetycji wiązania DNA. Sugeruje się, że zamiast naśladować początkowy stan wiązania DNA i konkurować o jego miejsce wiązania, PRP rozpoznają kompleks enzymu, który jest stabilizowany przez wiązanie fluorochinolonu. Interakcja ta powoduje destabilizację kompleksu, w wyniku której dochodzi do dysocjacji fluorochinolonu z miejsca wiązania i uwolnienia enzymu. Pozwala to na kontynuowanie reakcji przez gyrazę. Istnieje jeszcze inny, alternatywny model działania PRP. W tym modelu PRP

naśladuje segment T który jest transportowany podczas reakcji superskręcania PRP jest wychwytywany przez kompleks gyraza-DNA, w którym segment G jest już związany.

Celem niniejszej pracy było dostarczenie informacji strukturalnych i biochemicznych na temat interakcji między białkami PRP a gyrazą DNA z *Escherichia coli*. Uzyskane dane wykorzystano do próby wyjaśnienia obserwowanej specyficzności działania hamującego i ochronnego, w którym pośredniczą różne białka PRP. Na podstawie uzyskanych wyników zbudowano nowy model interakcji gyrazy z białkami PRP.

Podczas badań analizowano działania trzech różnych PRP. QnrB1 z *Klebsiella pneumoniae* odpowiedzialny za oporność na fluorochinolony, AlbG z *Xanthomonas albilineans* odpowiedzialny za ochronę przed albicydyną oraz McbG z *Escherichia coli* odpowiedzialny za ochronę przed mikrocyną B17. Albicydyna i mikrocyna B17 są naturalnie syntetyzowanymi toksynami wiążącymi gyrazę, które podobnie jak fluorochinolony oddziałują z gyrazą poprzez stabilizację kompleksu gyraza: DNA: fluorochinolon.

Białko QnrB1 zostało oczyszczone i przeanalizowane biochemicznie oraz strukturalnie. W trakcie analiz potwierdzono specyficzność protekcji w stosunku do fluorochinolonów. Wykazano, że białko skutecznie destabilizuje kompleks gyraza: DNA: fluorochinolon w obecności hydrolizy ATP. Ustalono, że hydroliza jest niezbędna do ochronnego działania białka QnrB1. Dodatek QnrB1 stymulował aktywność ATPazową gyrazy DNA. W trakcie analiz biochemicznych stwierdzono, że gyraza B jest głównym celem interakcji białka QnrB1. Reakcja sieciowania indukowana UV z ortogonalnym aminokwasem inkorporowanym do QnrB1 wykazała miejsca interakcji z enzymem w białku QnrB1.

Model strukturalny QnrB1: DNA: gyraza: moxifloxacyna został zbudowany w oparciu o dane Cryo-EM. Dane strukturalne potwierdziły obserwacje biochemiczne interakcji QnrB1 z gyrazą B. Uzyskane dane dla QnrB1 pozwoliły zaproponować nowy model interakcji PRP z gyrazą. Wydaje się, że prawidłowy mechanizm zawiera w sobie pewne elementy mimikry segmentu T i rozpoznawania kompleksu gyraza: DNA. QnrB1 wydaje się obierać drogę segmentu T podczas wiązania do enzymu, a działanie ochronne ma miejsce za pośrednictwem rozpoznania specyficznych cech struktury kompleksu gyraza: DNA: fluorochinolon.

Białko AlbG analizowano podobnie jak QnrB1. Wykazano jego zdolność do destabilizacji kompleksu gyraza: DNA; albicydyna i specyficzność wobec albicydyny. W przeciwieństwie do QnrB1, wykazano interakcję AlbG z obiema podjednostkami gyrazy podczas eksperymentów sieciowania. AlbG nie stymulował aktywności ATPazy gyrazy. Mutacja AlbG z delecją pętli, nie wykazała aktywności ochronnej przeciwko albicydynie. Wyniki, te mogą korelować z danymi przedstawionymi dla białka QnrB1 pozbawionego pętli. Białka chimeryczne: AlbG z pętlą QnrB1 i QnrB1 z pętlą AlbG nie wykazały żadnej aktywności, co sugeruje, że sama pętla obecna w strukturze niektórych białek PRP nie jest jedynym czynnikiem determinującym swoistość PRP.

Struktura białka McbG badanego w pracy, w przeciwieństwie do QnrB1 i AlbG, nie jest znana. W pracy zastosowano kilka metod ekspresji w celu uzyskania większej ilości białka do krystalizacji. Pomimo wysiłków ekspresja nie była skuteczna i dane krystalograficzne nie zostały pomyślnie zebrane. Eksperymenty biochemiczne wykazały ochronną aktywność McbG wobec mikrocyny B17. Niestety, mała ilość i niestabilność oczyszczonego białka pozwoliła jedynie na ograniczoną analizę biochemiczną.

Wyniki uzyskane w pracy pozwoliły sformułować nowy model działania PRP oddziałujących z gyrazą. Zebrane dane można wykorzystać do projektowania nowych cząsteczek inhibitorów gyrazy przy użyciu badań strukturalnych, które mogą utorować drogę do przezwyciężenia problemu oporności gyrazy na środki przeciwdrobnoustrojowe.