

Streszczenie

DNA odgrywa kluczową rolę we wszystkich żywych organizmach, będąc nośnikiem zawierającym ich genetyczny plan budowy. Ze względu na to, że informacja ta jest zapisana liniowo, zasada po zasadzie, niemożliwym byłoby przechowywanie jej jako pojedynczego rozciągniętego łańcucha, ponieważ ten nie zmieściłby się w komórce. W bakteriach DNA jest przechowywane w wysoce skręconej postaci, a za utrzymanie tego upakowania odpowiadają wyspecjalizowane enzymy zwane topoizomerazami. Mogą one rozciąć, skręcić i ponownie połączyć podwójną helisę DNA, w ten sposób osiągając pożądane upakowanie. Pośród topoizomeraz, jeden enzym – gyraza DNA, wyróżnia się wyjątkową zdolnością do negatywnego superskręcania DNA.

Gyraza występuje przede wszystkim w bakteriach, ale obecna jest również w Archeonach oraz w organizmach eukariotycznych z grupy Apikompleksów. Ze względu na to, iż wiele z bakterii to organizmy chorobotwórcze, a gyraza DNA nie występuje u ludzi, stanowi ona atrakcyjny cel dla opracowywania antybiotyków. Zahamowanie działania gyrazy DNA zakłóca mechanizmy utrzymania DNA i może doprowadzić do śmierci komórki. Wiele z obecnie stosowanych chemioterapeutyków wykorzystuje ten fakt i w świetle stale rosnącej oporności na nie, badania gyraz i ich inhibitorów pozostają bardzo ważnym tematem prac naukowych.

Głównym celem niniejszej pracy było poszerzenie wiedzy na temat gyraz DNA niebakteryjnego pochodzenia w ten sposób wspomagając rozwój nowych terapii celujących w ten enzym. W szczególności podjęta została próba odkrycia nowego małowcząsteczkowego związku ukierunkowanego specyficznym na gyrazę z *Plasmodium falciparum*, aby wesprzeć walkę z malarią. Dodatkowo, struktura oraz aktywność biochemiczną gyrazy pochodzącej z archeonu *Archaeoglobus sulfaticallidus* została zbadana, w celu rozszerzenia wiedzy na temat archealnych gyraz oraz odkrycia i opisanie wyjątkowych cech pozwalających im na pełnienie przez nie funkcji w ekstremalnym środowisku.

W pierwszej części pracy, w celu znalezienia potencjalnego leku przeciwmalarycznego, podjęto próbę ekspresji i oczyszczenia kompleksu gyrazy z *Plasmodium falciparum* (PfGyr). Gyraza DNA składa się z dwóch podjednostek – GyrA i GyrB, a jej funkcjonalny kompleks działa jako heterotetramer GyrA₂GyrB₂. Mimo tego, iż przygotowanie podjednostki PfGyrA nie było możliwe, ilość pozyskanej

podjednostki *PfGyrB* była wystarczająca, a sama podjednostka była aktywna w heterokompleksie z *GyrA* z *E. coli*. Wykorzystując ten hybrydowy kompleks *EcGyrAPfGyrB*, w ramach badań przesiewowych biblioteki związków małowcząsteczkowych odkryto dwóch nowych najbardziej obiecujących kandydatów: czerwień alizaryny S i purpurogalinę. Purpurogalina została następnie szczegółowo przebadana pod względem mechanizmu działania przy użyciu kompleksu hybrydowego z *E. coli*, oraz udowodniono, że jej aktywność jest specyficzna wobec *PfGyrB*. Potencjalne zastosowanie purpurogaliny jako środka przeciwmalarycznego zostało dodatkowo potwierdzone w badaniach *in vivo* pokazujących hamowanie wzrostu *Plasmodium falciparum* przez ten związek drobnocząsteczkowy.

Ponieważ otrzymanie pełnego kompleksu *PfGyr* okazało się niemożliwe, do przeprowadzenia drugiej, strukturalnej części badań wybrana została inna gyraza nie pochodząca z bakterii – gyraza z hipertermofilnego archeonu *Archaeoglobus sulfaticallidus*. Celem tej części badań było pozyskanie nowych informacji o strukturze i funkcji tej uprzednio nie opisanej gyrazy DNA. Ze względu na pracę w środowisku charakteryzującym się podwyższoną temperaturą i stężeniem soli, enzym ten powinien posiadać wyraźne adaptacje, podkreślając niektóre kluczowe cechy wszystkich gyraz, czyniąc go interesującym przedmiotem badań. Gyrazę *AsGyr* pozyskano z dużą wydajnością i o wysokiej czystości, co pozwoliło na jej dogłębną charakterystykę z wykorzystaniem metod biochemicznych, biofizycznych oraz przy użyciu najnowszych osiągnięć w kriogenicznej mikroskopii elektronowej (cryo-EM). Pozwoliło to na dokładny opis jej aktywności oraz struktury o wysokiej rozdzielczości.

Jedną z najbardziej uderzających cech odkrytych w enzymie *AsGyr* jest jego unikalna C-końcowa domena podjednostki *GyrA* (*GyrA_CTD*), będąca częścią gyrazy odpowiedzialną za wiązanie i zawijanie DNA. Domena ta charakteryzuje się wyjątkowym wysoce dodatnim rozkładem ładunku na swojej powierzchni. Więcej informacji o tej domenie dostarczyły badania porównujące aktywności *AsGyr*, *EcGyr* oraz przygotowanego mutantu *AsGyr* naśladującego rozkładu ładunku na *EcGyrA_CTD*. Wykazano, że rozkład ładunku odgrywa kluczową rolę w stabilizacji kompleksu DNA-enzym, zwłaszcza w zapobieganiu poślizgowi DNA, który może wystąpić szczególnie w podwyższonej temperaturze i wysokim stężeniu soli.

Kolejną adaptacją *AsGyr* jest brak tak zwanego 'kwaśnego ogona' na C-końcu domeny *AsGyrA_CTD*. Fragment ten jest zwykle wymagany do destabilizacji

kompleksu gyrazy z DNA, w celu zwiększenia procesywności enzymu. W organizmach żyjących w podwyższonej temperaturze takie mechanizmy okazują się nie być konieczne, ze względu na podwyższoną energię cieplną otoczenia, a adaptacje w tych organizmach służą głównie zwiększeniu stabilności kompleksu.

Badania aktywności superskręcania DNA przez AsGyr wykazały, że jej zdolność do wprowadzania negatywnych superskrętów do DNA jest niezwykle wydajna. Ponadto, analiza biochemiczna pokazała, że AsGyr potrafi relaksować pozytywnie superskręcone DNA bez wykorzystania ATP, co według obecnego stanu wiedzy nie powinno być możliwe. Co więcej, taka aktywność została zaobserwowana również dla eksperymentów kontrolnych przeprowadzonych dla EcGyr. To odkrycie stoi w sprzeczności z ogólnie przyjętym zakresem aktywności przeprowadzanych przez gyrazy i uzasadnia potrzebę ponownego przyjrzenia się obecnemu stanowi wiedzy.

Dodatkowo otrzymana struktura jest pierwszą strukturą cryo-EM gyrazy w kompleksie z DNA i moksyflokscyną (popularnym chemioterapeutycznym). Struktura ta pozwoliła na weryfikację aktualnej wiedzy na temat sposobu działania tego leku w warunkach bardziej naturalnych niż uprzednio dostępne dane krystalograficzne.

Podsumowując, w tej pracy zostały zbadane dwie gyrazy DNA nie pochodzące z bakterii – gyrafa z *Plasmodium falciparum* jako potencjalny cel nowych związków przeciwmalarycznych oraz gyrafa z *Archaeoglobus sulfaticallidus* w kontekście badań strukturalnych i aktywności. Dla PfGyr opisany został nowy, selektywny względem PfGyrB inhibitor, który może być wykorzystany do stworzenia nowej generacji leków przeciwmalarycznych. Badania skoncentrowane na AsGyr ujawniły adaptacje gyrazy do ekstremalnych warunków środowiskowych, w tym, wysokiego stężenia soli oraz wysokiej temperatury. Badania te podkreślają specyficzność oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy gyrazą a DNA, które sterują wiązaniem i rozwiązywaniem kompleksu gyrafa-DNA. Dodatkowo struktura AsGyr w kompleksie z DNA i moksyflokscyną pozwoliła zweryfikować stan wiedzy o wiązaniu tego leku, a badania biochemiczne pokazały, że wszystkie gyrazy potencjalnie posiadają możliwość relaksowania pozytywnie superskręconego DNA niezależnie od ATP, wbrew powszechnie przyjętym poglądom.

Luzana Palon - Stępieni