

Received: 2014.01.22  
Accepted: 2014.04.10  
Published: 2014.06.03

## W poszukiwaniu nowych antybiotyków – inhibitory replikacji chromosomów bakteryjnych\*

### Searching for new antibiotics – inhibitors of bacterial chromosome replication

Damian Trojanowski<sup>1\*\*</sup>, Patrycja Skut<sup>1</sup>, Joanna Hołowska<sup>2</sup>, Marcin Jan Szafran<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

<sup>2</sup> Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, we Wrocławiu

#### Streszczenie

Nadmierne i często nieuzasadnione używanie antybiotyków stawia ludzkość w obliczu problemu rosnącej liczby lekoopornych szczepów bakteryjnych. Stąd konieczne jest poszukiwanie nowych antybiotyków oraz badanie nowych celów dla leków przeciwbakteryjnych. Dobrymi kandydatami białek niezbędnych do wzrostu, a jednocześnie różniącymi się znacząco od eukariotycznych homologów wydają się białka zaangażowane w replikację bakteryjnego chromosomu (helikaza, polimeraza, prymaza), a także utrzymujące jego prawidłową przestrzenną strukturę (topoizomerazy). W ostatnich latach opracowano wiele wysokoprzepustowych metod poszukiwania związków hamujących aktywność białek uczestniczących w procesie replikacji chromosomów bakteryjnych. Przedmiotem artykułu jest przedstawienie niektórych z nich.

#### Słowa kluczowe:

replikacja • topologia DNA • chromosom bakteryjny • inhibitor • replisom • topoizomerazy • polimeraza DNA

#### Summary

The excessive and often unreasonable use of antibacterial drugs leads to rise of antibiotic-resistant strains. To overcome this problem, new antibiotics are searched and the new drug targets are investigated. The proteins involved in replication of bacterial chromosomes seem to be promising candidates for drug targets since they are involved in crucial life pathways and are structurally and/or functionally different from the eukaryotic homologues. Within last few years, a large number of newly developed methods allowed to search among thousands of molecules for the ones that specifically inhibit DNA synthesis in the prokaryotic cell. In this review, we present some of these methods.

#### Key words:

replication • DNA topology • bacterial chromosome • inhibitor • replisome • topoisomerases • DNA polymerase

#### Full-text PDF:

<http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1106890>

#### Word count:

4313

#### Tables:

3

#### Figures:

5

#### References:

80

\* Badania sfinansowane zostały ze środków Wrocławskiego Centrum Badań EIT+ w ramach realizacji projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” – BioMed (POIG.01.01.02-02-003/08) finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.1.2).

**Adres autora:** mgr Marcin Jan Szafran, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, ul. Joliot-Curie 14A, 50-383 Wrocław; e-mail: marcin.szafran@uni.wroc.pl

## WSTĘP

Odkrycie penicyliny w latach 20 ub.w. zapoczątkowało erę antybiotyków. Obecnie, ze względu na nadmierne i często nieuzasadnione ich używanie, stoimy w obliczu problemu rosnącej liczby lekoopornych szczepów bakteryjnych. Łatwość w przekazywaniu genów oporności na antybiotyki wśród bakterii oraz presja selekcyjna wywierana przez częste podawanie leków antibakteryjnych, doprowadziły do pojawienia się drobnoustrojów niewrażliwych na coraz większą liczbę antybiotyków. Wśród nich wyróżnić można szczepy odporne na określone grupy związków, np. odporny na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe szczep *Staphylococcus aureus* (MRSA - methicilin resistant *S. aureus*) [12] oraz szczepy wielolekooporne, takie jak MDR (multiple drug resistant) *Mycobacterium tuberculosis*, który w 2010 r. spowodował około 290 000 zachorowań na gruźlicę płuc [34]. W ostatnich latach pojawiły się również szczepy o rozszerzonej oporności, tzw. XDR (extensively drug resistant), do których należy szczep *Klebsiella pneumoniae* wywołujący zapalenie płuc [50] oraz całkowitej oporności - PDR (pandrug resistant) np. *Pseudomonas aeruginosa*, będący przyczyną oportunistycznych infekcji u ludzi [20].

Mechanizmy działania stosowanych najczęściej antybiotyków polegają na zaburzeniu syntezy ściany komórkowej (m.in. penicyliny, cefalosporyny, wankomycyny), hamowaniu biosyntezy białek (m.in. tetracykliny, erytromycyna, chloramfenikolu, streptomycyny) i blokowaniu procesu replikacji (kumaryny, chinolonów). Ze względu na rosnącą oporność chorobotwórczych bakterii na znane antybiotyki, konieczne jest poszukiwanie nowych celów dla antybiotykoterapii. Najlepszymi spośród nich są białka niezbędne do wzrostu i namnażania się komórek bakteryjnych, a równocześnie takie, które nie występują w komórkach ludzkich lub znacząco się od nich różnią [53].

Rozwój technik biologii komórki stwarza nowe możliwości badania oraz wizualizacji subkomórkowych struktur bakterii. Ostatnie badania dowodzą, że chromosom bakteryjny w komórce przyjmuje strukturę wysoce zorganizowaną, zbudowaną z wielu topologicznie niezależnych, superskręconych domen DNA związanych z białkami NAP (nucleoid associated proteins) [10,18]. Domenowa organizacja pozwala na jednoczesne zaangażowanie odrębnych regionów chromosomu w różne procesy komórkowe, takie jak replikacja i segregacja nowo zreplikowanych obszarów chromosomu, a także transkrypcja i rekombinacja materiału genetycznego [64]. Chromosom ulega podwojeniu i segregacji do komórek potomnych w ściśle określonym czasie, a procesy te ze względu na swoją istotność dla przeżycia komórki są precyzyjnie kontrolowane. W ostatnich latach poznano strukturę i funkcję wielu białek zaangażowanych w powielanie bakteryjnego materiału genetycznego. Przedmiotem artykułu jest przedstawienie metod poszukiwania nowych celów dla

antybiotyków wśród białek uczestniczących w procesie replikacji chromosomów bakteryjnych. Omówiono przykłady białek-celów uczestniczących bezpośrednio w syntezie DNA oraz takich, które kontrolują jego topologię w trakcie tego procesu.

## REPLIKACJA DNA U BAKTERII I EUKARIOTÓW – TAK PODOBNA, A TAK RÓŻNA

Replikacja DNA jest podstawowym procesem komórkowym zachodzącym we wszystkich żywych organizmach. U organizmów prokariotycznych, w przeciwieństwie do eukariotów, synteza DNA nie zachodzi w odrębnym, odpowiadającym jądro komórkowemu, przedziale komórki. Replikacja chromosomu w optymalnych warunkach zajmuje bakteriom *E. coli* około 40 min, podczas gdy komórki eukariotyczne potrzebują na skopiowanie całego chromosomu 18-24 godzin [65]. U bakterii i eukariotów mechanizm replikacji chromosomów oraz niektórych plazmidów wygląda podobnie. Jest to dwukierunkowy proces, w którym polimerazy DNA przeprowadzają syntezę w kierunku 5'→3' (na nici wiodącej i opóźnionej), poczynając od krótkich starterowych fragmentów RNA syntetyzowanych przez prymazę [65]. W przeciwieństwie do eukariotów, bakterie rozpoczynają syntezę DNA chromosomalnego w jednym, ściśle określonym miejscu zwanym *oriC* (origin of chromosomal replication) [47]. Proces inicjowany jest przez białko DnaA, które wiążąc się do kilkunastu krótkich, swoistych sekwencji nukleotydowych w regionie *oriC*, oligomeryzuje i powoduje rozplecenie helisy DNA [35]. W skład maszynarii replikacyjnej (zwanej replisomem), przeprowadzającej syntezę DNA wchodzi: prymaza (DnaG) - syntetyzuje startery RNA, helikaza (DnaB) - rozplata nić DNA w miarę przesuwania się widełek replikacyjnych oraz polimeraza DNA III (Pol III). Ze względu na to, że synteza DNA zachodzi zawsze w kierunku 5'→3', tylko jedna nić (wiodąca) może być syntetyzowana w sposób ciągły. Druga nić (opóźniona) powstaje przez syntezę odcinków DNA (fragmentów Okazaki), które są następnie ze sobą łączone [31,44]. U bakterii replikacja kończy się w obrębie sekwencji *ter*, a nowo powstałe chromosomy są rozdzielane (w procesie dekatencji) przez topoisomerazę IV (tabela 1).

Pomimo wielu podobieństw w procesie replikacji u bakterii i eukariotów, różnice w budowie komórek oraz w wielkości i liczbie chromosomów bakteryjnych i eukariotycznych przekładają się na różnice w składzie i budowie aparatu replikacyjnego oraz zestawie białek modulujących strukturę i topologię DNA. Głównym enzymem syntetyzującym DNA u bakterii jest polimeraza DNA III, która stanowi heteromultimeryczny kompleks odpowiedzialny za syntezę obu nici DNA (wiodącej i opóźnionej) [45]. Rdzeniem enzymu są stabilizująca inne elementy podjednostka  $\theta$  [68] oraz

Tabela 1. Charakterystyka bakteryjnych topoizomeraz

Podtyp	Enzym	Charakterystyka podtypu	Struktura podjednostki	Inhibitor	Referencje
IA	Bakteryjna topoizomeraza I (TopoI)	Relaksacja ujemnych superskrętów	Monomer	Kamptotecyna	[74]
	Drożdżowa topoizomeraza III (TopoIII)		Monomer	Analogi kamptotecyny Irinotekan Topotekan	[76]
	Ssacza topoizomeraza III (Top3β)	Relaksacja ujemnych i dodatnich superskrętów, katenacja i dekatencja	Monomer	9-amino-CPT G1147211 Gimatekan Belotekan SN-38	[29] [51] [54] [71] [73]
	Bakteryjna topoizomeraza III (TopoIII)		Monomer	Indenoizochinolony Indotekan (LMP400) Indimitekan (LMP776)	[17]
	Bakteryjna odwrotna gyraza ( <i>Methanopyrus kandleri</i> )	Relaksacja ujemnych przez wprowadzanie dodatnich superskrętów	Heterodimer	Ibenzonaftrydyny Genz 644282 =SAR402674	[13]
	Eukariotyczna topoizomeraza I (Top1)	Relaksacja ujemnych i dodatnich superskrętów	Monomer	Saintopina UCE6	[15]
	Topoizomeraza wirusa ospy krowiej	Relaksacja ujemnych i dodatnich superskrętów	Monomer	UCE1022	[60]
IB	Bakteryjna topoizomeraza V ( <i>Methanopyrus kandleri</i> )	Relaksacja ujemnych dodatnich superskrętów	Monomer	TAN-1518	
				Pochodne indokarbazolu KT6006, KT6528, ED-110, NB-506	
IIA	Bakteryjna gyraza (GyrA, GyrB)	Relaksacja dodatnich przez wprowadzenie ujemnych superskrętów	Heterotetramer	Barwniki Hoechst 33342 i 3325	[62]
				Ekstrakty roślinne BC-4-1 Epiberberyna, Nitydyna, Fagaronina	
	Bakteryjna topoizomeraza IV (ParC, ParE)	Dekatenacja, relaksacja dodatnich i ujemnych superskrętów	Heterotetramer	Fosfolipidy, Kardioliopina	
				Antracyliny Daunorubicyna Doksorubicyna Epirubicyna Aklarubicyna	[1] [30] [49] [66]
				Etopozyd (VP-16) Tenipozyd	[33]
				Mitoksantron	[72]
Ssacza topoizomeraza IIα (Top2α)	Relaksacja dodatnich i ujemnych superskrętów, kondensacja i dekondensacja chromosomów	Homodimer	Suramina Fostriecyna	[32]	
Ssacza topoizomeraza IIβ (Top2β)			Homodimer		
Drożdżowa topoizomeraza II (Top2)				F14512 (C.D.)	[19]
IIB	Bakteryjna topoizomeraza VI ( <i>Sulfolobus shibatae</i> )	Dekatenacja, relaksacja dodatnich superskrętów	Heterotetramer	C-1311 (C.D.) XK-469 (C.D.) ICRF-187 Merbaron	
				Kumaryny, Novobiocyna Kumermycyna, Chlorobiocyna Akrydyny m-AMSA	
				Chinolony 1-jej generacji Kwas nalidiksowy, Kwas oksolinowy	[5]
				Chinolony 2-jej generacji Peфлоksacyna, Ciprofloksacyna Norfloksacyna, Ofloksacyna	
				Chinolony 3-jej generacji Lewofloksacyna, Gatifloksacyna	
				Chinolony 4-jej generacji Gemifloksacyna Moksyfloksacyna	
				Pochodne toksyny ParE Izoflawonoidy Genisteina	

Tabela 2. Porównanie składników replisomu bakteryjnego i eukariotycznego

Białko	Funkcja	Bakterie	Eukariota	Referencje
Polimeraza DNA I	aktywność 5'→3' polimerazy, 5'→3' egzonukleazy i 3'→5' egzonukleazy	+	-	[40]
Polimeraza DNA III	aktywność 5'→3' polimerazy i 3'→5' egzonukleazy	+	-	[7, 31, 45]
Polimeraza DNA α	aktywność 5'→3' polimerazy, rozpoczyna syntezę DNA w kompleksie z prymazą, niska procesywność	-	+	[75]
Polimeraza DNA δ	aktywność 5'→3' polimerazy i 3'→5' egzonukleazy	-	+	[75]
Polimeraza DNA ε	aktywność 5'→3' polimerazy, rola regulatorowa	-	+	[75]
Polimeraza DNA γ	aktywność 5'→3' polimerazy, replikacja DNA mitochondrialnego	-	+	[75]
Białka inicjujące	wiązanie w miejscu startu replikacji	+	-	[31, 75]
Prymaza	polimeraza RNA, synteza starterów	+	-	[4, 31, 75]
Helikaza DNA	rozplatanie dsDNA	+	-	[31, 75]
SSB (single stranded binding protein)	opłaszczanie ssDNA	+	-	[31, 59, 75]
Topoizomerazy typu I i II	usuwanie superskrętów i dekatencja	+	-	[49, 51, 74, 75]
Gyryza DNA	topoizomeraza typu II, prowadzenie ujemnych superskrętów	+	-	[66]
Ligaza DNA	łączenie wolnych końców DNA	+	-	[40, 75]
Telomeraza	aktywność 5'→3' odwrotnej transkryptazy	-	+	[75]

dwa białka o aktywności enzymatycznej - podjednostki α i ε, kodowane odpowiednio przez geny *dnaE* i *dnaQ*. Aktywność 5'→3' polimerazy wykazuje podjednostka α, natomiast podjednostka ε ma aktywność 3'→5' egzonukleazy i jest odpowiedzialna za korekcję błędnie wbudowanych nukleotydów. Za dimeryzację rdzenia polimerazy III DNA odpowiadają natomiast podjednostki τ. Elementem utrzymującym polimerazę na nici DNA podczas replikacji (procesywność) jest tzw. β-klamra zbudowana z dwóch cząsteczek białka DnaN. Dodatkowymi elementami strukturalnymi enzymu są podjednostki γ, δ, δ', χ i ψ [7]. W komórkach eukariotycznych aktywność 5'→3' polimerazy wykazują: polimeraza DNA α i polimeraza DNA δ. Polimeraza DNA α inicjuje replikację w kompleksie z prymazą, natomiast polimeraza DNA δ odpowiada za syntezę nici wiodącej. Charakteryzuje się większą procesywnością oraz przejawia dodatkowo aktywność 3'→5' egzonukleazy. Ze względu na to, że bakterie inicjują replikację w jednym i ściśle zdefiniowanym miejscu, a replikacja u eukariotów rozpoczyna się w wielu miejscach, organizmy te różnią się między sobą nie tylko rodzajem polimeraz, ale również liczbą ich kopii w komórce. W komórce eukariotycznej znajduje się 20 000-60 000 cząsteczek polimerazy DNA α, podczas gdy u bakterii *E. coli* występuje tylko 10-20 cząsteczek polimerazy DNA III [21]. Różnice między bakteriami a eukariotami uwidaczniają się również w przypadku czynników odpowiedzialnych za inicjację replikacji. U większości bakterii homologi białka DnaA z udziałem ATP inicjują rozplatanie dwuniciowego DNA w regionie *oriC* [35]. Natomiast w komórkach eukariotycznych za inicjację replikacji odpowiada kompleks utworzony przez wiele białek.

Różnice między białkami tworzącymi replisom u bakterii i eukariotów są na tyle duże (tabela 2 i 3), że czynią te pierwsze atrakcyjnym celem antybiotykoterapii. Dodatkowo komponenty replisomów mogą się różnić także między poszczególnymi gatunkami bakterii, co stwarza możliwość zaprojektowania leku o wąskim spektrum działania, a nawet ukierunkowania go przeciwko konkretnym patogenom [53]. Replikacja jest jednak trudnym celem terapii antybakteryjnej. Jednym z powodów tych trudności jest współistnienie w genomie kilku kopii genów kodujących białka replikacyjne. Genomy wielu gatunków z rodzaju *Bacillus* zawierają dodatkową kopię genu *dnaN*, *dnaN-2*, który koduje białko DnaN-2, wykazujące 40% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej względem białka DnaN [53]. Stąd celując w białka replikacyjne mające dodatkowe kopie, należy jednoznacznie ustalić rolę ich homologów w procesie replikacji DNA.

Przemieszczanie się widełek replikacyjnych w czasie syntezy DNA powoduje zmiany w strukturze i topologii chromosomu. Generowane są zmiany superskręcenia chromosomu (powstają odpowiednio pozytywne superskręty przed kompleksem replikacyjnym oraz negatywne za nim) zwane stresem topologicznym. Za eliminację nagromadzonych superskręceń odpowiadają wyspecjalizowane enzymy - topoizomerazy (tabela 1). Topoizomerazy przejściowo nacinając jedną (typ I) lub obie (typ II) nici DNA, prowadzą do zmian w liczbie superskrętów DNA (liczby opleceń jednej helisy DNA wokół drugiej). Chociaż enzymy te działają przede wszystkim lokalnie

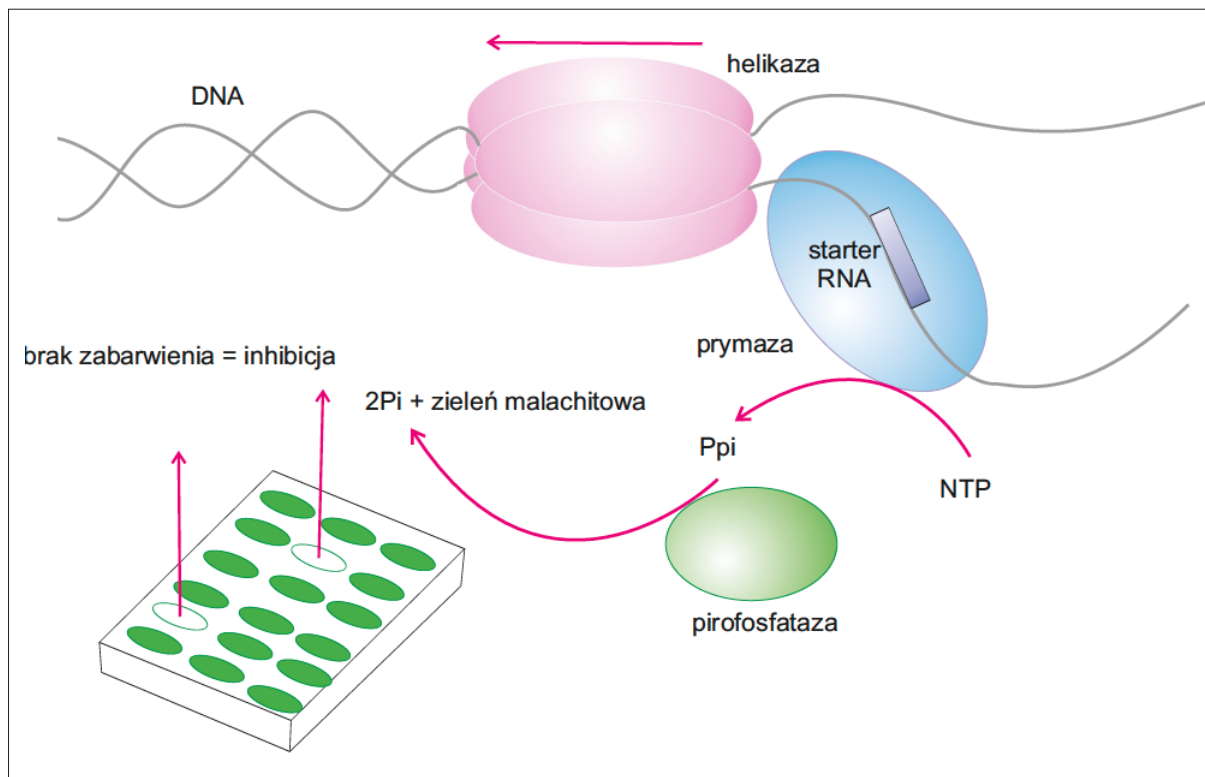
Tabela 3. Inhibitory białek składowych replisomów

Cel dla antybiotyku	Inhibitor	Działanie	Rodzaj testu	Referencje
Helikaza DnaB	Myricetyna	Naturalnie występujący flawonoid, antyoksydant, hamuje helikazę RepA i DnaB	Test wygaszania fluorescencji z użyciem specyficznej sondy TNS	[26,77]
Prymaza/helikaza	Triaminotriazyny	Nieznane, mieszane inhibitory prymazy i helikazy	Wysokoprzepustowy test aktywności prymazy DnaG stymulowanej obecnością białka DnaB	[46,78]
Prymaza	Doxorubicyna	Cytostatyk z grupy antracyklin, interkalator DNA, stosowany w terapii przeciwnowotworowej	Test aktywności prymazy - pirofosfatazy	[78]
	Suramina	Cytostatyk, wykazuje działanie przeciwpierwotniakowe, hamuje działanie bakteryjnej prymazy DnaG	Test aktywności prymazy - pirofosfatazy	[78]
PolC	6-anilinouracyle	Kompetytywne w stosunku do dGTP	Test hamowania wzrostu hodowli bakteryjnej, wysokoprzepustowy test luminescencji	[14,36, 69]
	Bischinole	Analogi dGTP	Wysokoprzepustowy fluorescencyjny test hamowania aktywności polimerazy PolC	[28,56]
	Cząsteczki hybrydowe (6AU i chinolony), np. 21D	Skojarzone działanie anty-PolC i hamujące gyrazę DNA	Test hamowania wzrostu hodowli bakteryjnej	[11,80]
DnaE1	Analogi pirymidynowe	Nieznane	Test hamowania wzrostu hodowli bakteryjnej	[57, 63]
DnaN	RU7	Blokuje oddziaływanie beta klamry z bakteryjną polimerazą DNA II, III i IV	Wysokoprzepustowy test anizotropowy	[22]
Ssb	CFAM, BCBP, BOTP, MPTA	Blokuje oddziaływanie pomiędzy Ssb i egzonukleazą I	Wysokoprzepustowy test polaryzacji fluorescencji	[41,42]

w regionach, w których dochodzi do generowania nadmiernego superskręcenia DNA, to funkcje komórkowe topoizomeraży należy również rozpatrywać w aspekcie globalnej regulacji topologii bakteryjnego chromosomu. Topoizomeraży regulując poziom superskręcenia w wielu miejscach chromosomu, w sposób skoordynowany prowadzą do zmiany całej jego struktury. Pociąga to za sobą zmiany w globalnym profilu ekspresji genów, których promotory są wrażliwe na zmiany w gęstości superhelikalnej DNA, w tym również wielu genów warunkujących przystosowanie się bakterii chorobotwórczych do bytowania w organizmie gospodarza (tzw. genów wirulencji). Białka remodelujące strukturę DNA, w tym przede wszystkim topoizomeraży, ze względu na swoje zaangażowanie w organizację chromosomu podczas replikacji materiału genetycznego oraz transkrypcji genów, wydają się doskonałym celem terapii przeciwbakteryjnych.

Ostatnie lata przyniosły rozwój specyficznych metod skupiających się na poszukiwaniu nowych inhibitorów procesu replikacji. Liczba nowo odkrywanych związków

stale wzrasta, jednak jak dotąd nie wprowadzono do leczenia żadnego z nich. Cząsteczki te działają na różne elementy replisomu dlatego można je podzielić na dwie grupy: blokujące aktywność białek o właściwościach enzymatycznych, takich jak polimeraza DNA, helikaza czy prymaza oraz zaburzających oddziaływanie między podjednostkami replisomów - cząsteczki wiążące się do białek SSB (single strand binding proteins) i DnaN. Coraz więcej nowo opracowywanych metod wykorzystuje techniki wysokoprzepustowe, które pozwalają na przesiewowe badanie setek tysięcy cząsteczek i selekcjonowanie tych o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu. Zastosowanie mają również metody oparte na komputerowym modelowaniu cząsteczek inhibitorów w oparciu o struktury dostępnych białek lub ich homologów, syntezie chemicznej cząsteczek analogicznych do znanych już inhibitorów czy krystalizacja wybranych białek w kompleksie z cząsteczkami inhibitora. Niżej przedstawiono kilka przykładowych metod poszukiwania inhibitorów białek replikacyjnych oraz topoizomeraży, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu replikacji DNA.



**Ryc. 1.** Wysokoprzepustowy test do pomiaru aktywności prymazy. Na matrycy jednoniciowego DNA, który jest generowany przez helikazę, prymaza prowadzi syntezę startera RNA przez polimeryzację trifosforanów nukleotydów. Jako produkt uboczny reakcji powstaje nieorganiczny pirofosforan, który zostaje przekształcony w obecności pirofosfatazy do dwóch reszt fosforanowych. Ilość uwolnionych reszt fosforanowych jest proporcjonalna do aktywności prymazy i jest oznaczana ilościowo w płytkach wielodołkowych w reakcji z wykorzystaniem zieleni malachitowej

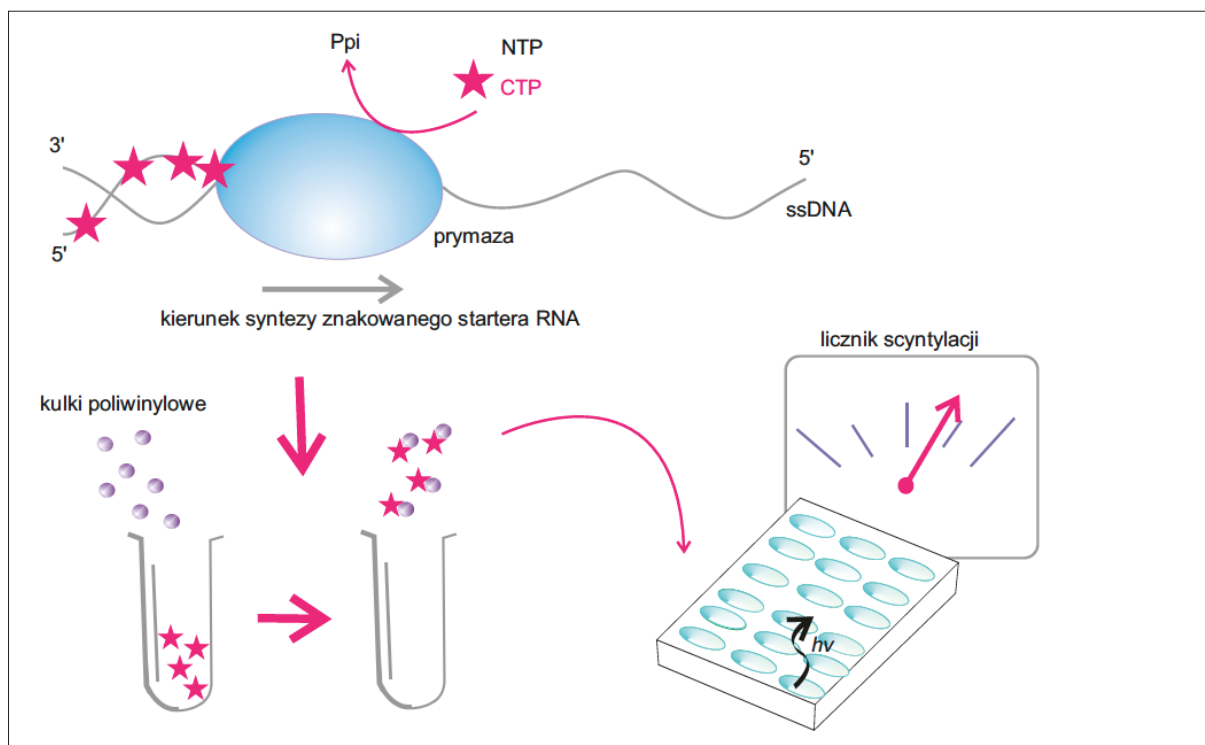
## METODY POSZUKIWANIA INHIBITORÓW BIAŁEK O AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Pierwszym etapem replikacji jest rozplecenie podwójnej helisy DNA w miejscu *oriC*, a następnie przyłączenie helikazy oraz prymazy, które tworzą tzw. prymosom. Helikaza, hydrolizując ATP, powoduje rozplecenie podwójnej helisy i umożliwia przesuwanie widełek replikacyjnych, natomiast prymaza syntetyzuje krótkie odcinki RNA, które służą następnie jako startery do syntezy nowych nici DNA. Oba enzymy są niezbędne do przeżycia bakterii [26]. Helikazy, oprócz replikacji, są zaangażowane również w inne procesy komórkowe, w tym naprawę DNA. W komórkach zarówno eukariotycznych jak i bakteryjnych występuje kilka ich paralogów; bakterie *E. coli* mają aż 12 różnych białek o aktywności helikazowej [77].

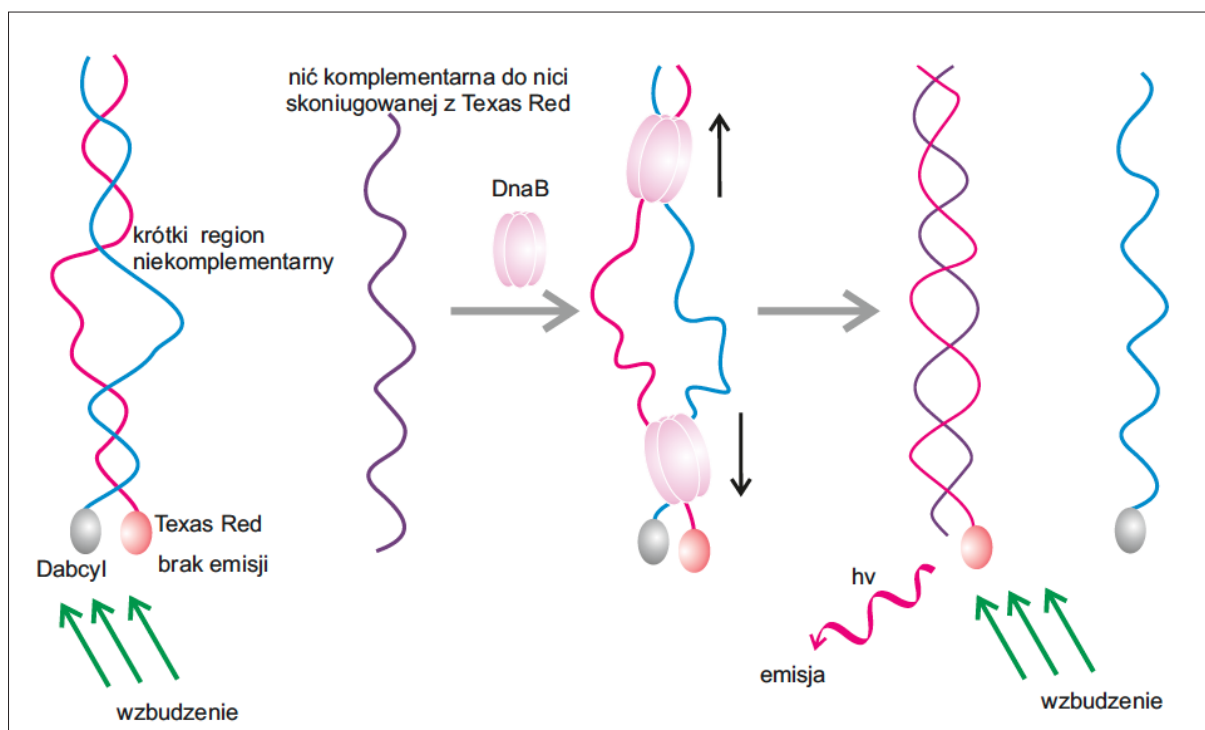
Bakteryjne funkcjonalne homologi helikazy i prymazy różnią się od ich eukariotycznych odpowiedników i dlatego stanowią atrakcyjny cel dla nowej generacji antybiotyków. Ponieważ w komórce bakteryjnej helikaza silnie oddziałuje z prymazą, a ponadto prymaza stymuluje aktywność helikazy, trudno jest badać każde z tych białek osobno. Jedną z metod, która pozwala na ilościowe oznaczenie aktywności prymazy DnaG w obecności helikazy DnaB jest wysokoprzepustowy test, polegający na sprzężeniu aktywności prymazy z reporterowym enzymem -

pirofosfatazą [6]. Difosforan powstający w wyniku działania prymazy jest substratem dla pirofosfatazy. Ta ostatnia przekształca go do dwóch reszt fosforanowych, których detekcję przeprowadza się kolorymetrycznie w płytkach wielodołkowych (ryc. 1). Metoda umożliwiła przeszkąwanie kolekcji wielu cząsteczek o potencjalnym hamującym działaniu na prymazę. Pozwoliła na wyselekcjonowanie trzech związków, z których dwa - doksorubicyna oraz suramina, wcześniej znane jako leki przeciwnowotworowe [37], okazały się silnymi inhibitorami prymazy. Autorzy sugerują, że działanie suraminy polega na konkurencji z trifosforanami nukleotydów o miejsce wiązania do prymazy. Podobnie jak suramina, również doksorubicyna zawiera w swojej strukturze grupy aromatyczne, które mogą się wiązać do miejsc aktywnych prymazy i w ten sposób uniemożliwiać wiązanie DNA lub trifosforanów rybonukleotydów [6].

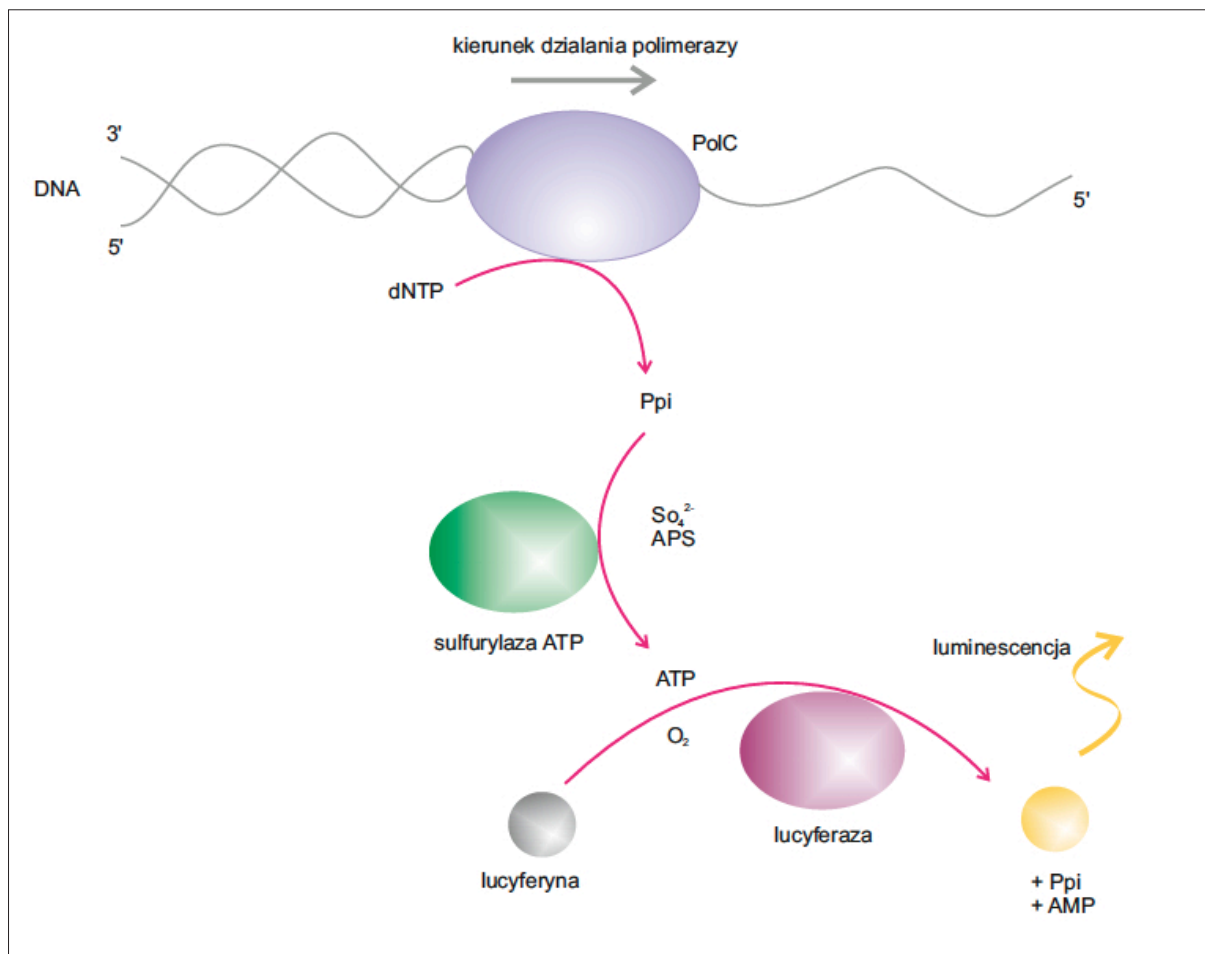
Pierwszą helikazą o znanej strukturze trzeciorzędowej było plazmidowe białko RepA, którego homologi są kodowane na plazmidach obecnych zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich [55]. Stąd poszukiwania inhibitorów replikacji skupiły się początkowo właśnie na tym białku. Wykazano, że naturalnie występujące wśród bakterii, grzybów i roślin wyższych związki flawonowe o strukturze podobnej do naftochinonu hamują helikazę RepA [11]. Jeden z testowanych związków, myricetyna



Ryc. 2. Scyntylny test do pomiaru aktywności prymazy. Prymaza na matrycy jednoliciowego DNA (ssDNA) syntetyzuje starter RNA w obecności znakowanego radioaktywnie trifosforanu cytozyny. Następnie startery zostają oczyszczone z mieszaniny reakcyjnej za pomocą kulek poliwinylowych i przeniesione do płytek wielodołkowych, w których dokonywany jest pomiar. Aktywność prymazy jest mierzona w liczniku scyntylnym, którego odczyt jest proporcjonalny do ilości produktów reakcji



Ryc. 3. Test do pomiaru aktywności helikazy (DnaB). Helikaza prowadzi do rozplecenia podwójnej helisy DNA w obrębie krótkiego niekomplementarnego regionu w syntetycznej cząsteczce DNA. Jedną z nici DNA jest znakowana na końcu fluoroforem TexasRed, natomiast nić komplementarna - cząsteczką Dabcyłu. Przestrzenne zbliżenie obu fluoroforów powoduje wygaszenie emisji przez cząsteczkę TexasRed po wzbudzeniu zielonym światłem. Na skutek działania helikazy obie nici zostają oddzielone od siebie, a następnie nić znakowana TexasRed hybryduje z obecną w mieszaninie reakcyjnej komplementarną nicią. Dzięki temu cząsteczka Texas Red zostaje oddzielona od cząsteczki Dabcyłu i po wzbudzeniu zielonym światłem, emituje czerwoną fluorescencję



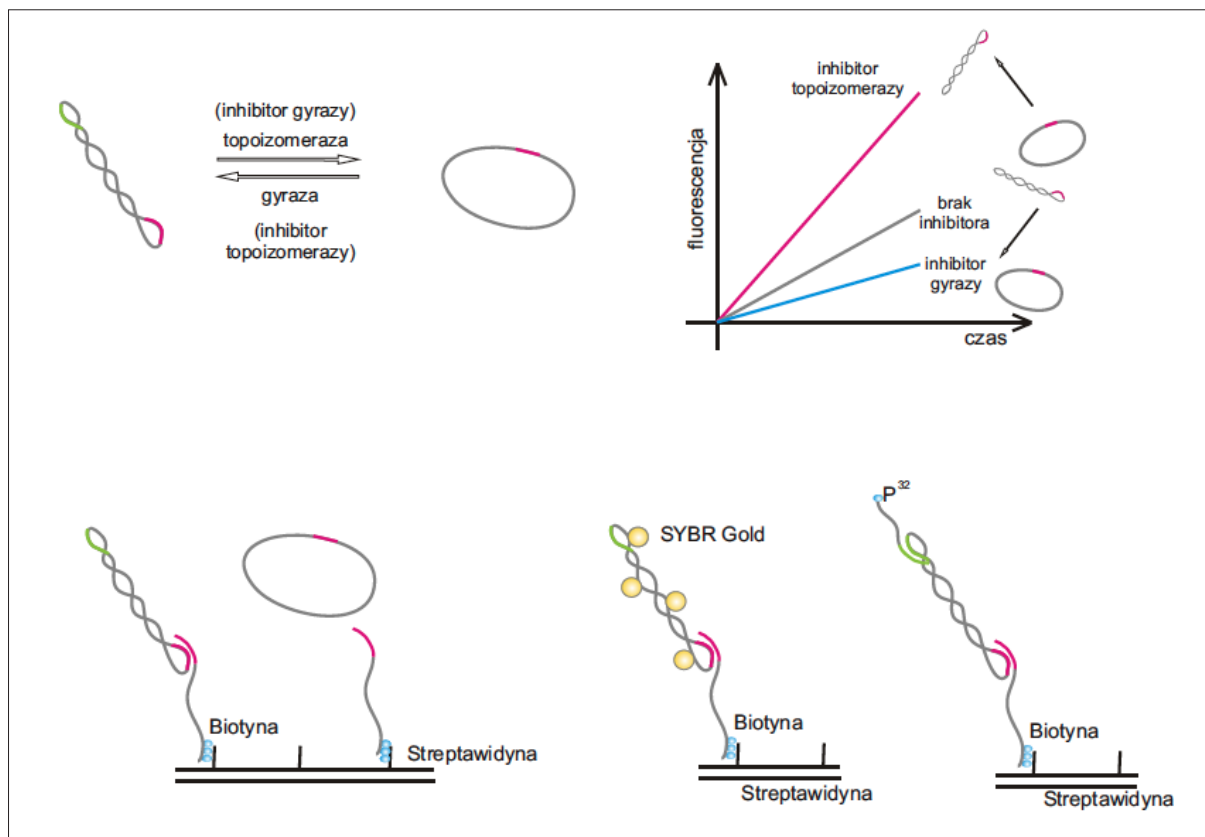
**Ryc. 4.** Test do pomiaru aktywności polimerazy III (PolC). Polimeraza PolC wzbudza syntezę nici komplementarnej na matrycy jednoniciowego DNA (ssDNA). Produktem ubocznym reakcji jest nieorganiczny pirofosforan, który w obecności jonów siarczanowych i nadsiarczanu amonu (APS), zostaje przekształcony do ATP w reakcji katalizowanej przez sulfurylazę ATP. Powstały ATP zostaje wykorzystany do utleniania lucyferyny w reakcji katalizowanej przez lucyferazę. Utleniona lucyferyna przechodzi w stan wzbudzony, wykazujący bioluminescencję, której pomiar jest proporcjonalny do aktywności polimerazy PolC

najsilniej hamował białko RepA zarówno *in vitro*, jak również *in vivo*. W późniejszych badaniach udowodniono, że myricetyna swoiście hamuje również kodowaną na chromosomie helikazę DnaB, lecz nie wpływa na aktywność bakteryjnej prymazy DnaG [26].

Zhang i wsp. opracowali wysokoprzepustowy test, umożliwiający badanie aktywności prymazy DnaG w obecności białka DnaB, które stymuluje aktywność prymazy [24]. W teście tym prymaza syntetyzuje startery RNA w obecności znakowanego izotopowo nukleotydu ( $[^3\text{H}]$ -CTP) na matrycy jednoniciowego DNA (ryc. 2). Poziom syntezy radioaktywnych starterów jest rejestrowany w liczniku scyntylacyjnym. Stosując opisany test poszukiwano związków o działaniu hamującym na jeden i/lub oba enzymy. Swoistość oddziaływania wyselekcjonowanych cząsteczek zweryfikowano badając aktywność helikazy DnaB za pomocą techniki FRET (fluorescence resonance energy transfer). Fluorescencja barwnika Texas Red związanej do 5'-końca dwuniciowego, częściowo rozpleczonego odcinka DNA była wyciszana przez cząsteczkę Dabcyly

umiejscowionego na komplementarnej nici (ryc. 3). Po rozpleceniu nici z barwnikiem Texas Red hybrydyzowała z obecną w mieszaninie reakcyjnej komplementarną nicią DNA niezwiązaną z wygaszaczem, co skutkowało przyrostem fluorescencji w próbce. Inhibitory, które hamowały syntezę starterów RNA, a nie hamowały rozplatania podwójnej helisy DNA, określano mianem swoistych względem prymazy, natomiast hamujące obie reakcje – inhibitorami mieszanymi. Metoda ta pozwoliła na wyselekcjonowanie cząsteczek z grupy triaminotriazyn, które autorzy opisują jako inhibitory helikazy DnaB. Triaminotriazyny nie wykazywały działania antybiotycznego przeciw bakteriom Gram-ujemnym, takim jak *P. aeruginosa* czy *E. coli*, a hamowały wzrost bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), a nawet grzybów z rodzaju *Candida*. Jednak związki z tej grupy wykazywały dużą cytotoksyczność względem komórek eukariotycznych w testach przeprowadzonych na liniach komórkowych HeLa. Triaminotriazyny wydają się ciekawymi związkami z punktu widzenia nowoczesnej antybiotykoterapii, konieczne są jednak ich modyfikacje mające na celu zmniejsz-





**Ryc. 5.** Wysokoprzepustowe techniki do poszukiwania inhibitorów topozomeraz oparte o zdolność tworzenia trójskładnikowego kompleksu plazmid:oligonukleotydy (opis w tekście)

szczenie cytotoksyczności oraz zwiększenie efektywności przenikania do komórek bakteryjnych

Najważniejszym białkiem w całym aparacie replikacyjnym jest polimeraza DNA. U większości bakterii rolę replikatywną polimerazy, w odróżnieniu od innych polimeraz biorących udział np. w naprawie DNA, pełni polimeraza DNA III (DnaE1). Badanie stechiometrii replisomu u bakterii *E. coli* wykazało, że na jedne widelki replikacyjne przypadają trzy cząsteczki białka DnaE1 [52]. Jednak niektóre Gram-dodatnie bakterie, takie jak *Bacillus subtilis*, mają dwie różne replikatywne polimerazy DNA, DnaE3 i PolC w widelkach replikacyjnych [53]. Polimeraza DnaE3 jest homologiem białka DnaE1, natomiast PolC zawiera dodatkową podjednostkę o aktywności 3'→5' egzonukleazowej, która jest homologiem podjednostki ε oraz wykazuje inną względem DnaE1/DnaE3 aranżację przestrzenną domen funkcjonalnych. Oba białka (PolC i DnaE3) są niezbędne do przeżycia *B. subtilis* [16].

Jak dotąd nie zidentyfikowano inhibitorów swoistych względem polimerazy DNA DnaE1. Jedynie Shakya i wsp. opisali podstawione różnymi grupami funkcyjnymi analogi nukleozydów pirymidynowych [57,63], które hamowały wzrost bakterii z rodzaju *Mycobacterium*. Mechanizm działania tych związków musi jeszcze zostać wyjaśniony. Wiadomo jednak, że pochodne 5-hydroksymetylotymidyny

hamowały replikację *E. coli*. Są tym bardziej interesujące, gdyż cechują się niewielką cytotoksycznością względem komórek eukariotycznych.

Polimeraza PolC wydaje się ciekawym obiektem w poszukiwaniu nowych antybiotyków. Wykazano, że dwie grupy związków: 6-anilinouracyle (6-AU) [14,28,36] i bischinole [28] hamowały aktywność białka PolC. Na uwagę zasługuje jeszcze trzecia grupa związków – cząsteczki hybrydowe, np. połączenie chinolonów z 6-anilinouracylem w sposób skojarzony hamowały aktywność zarówno białka PolC jak i gyrazy [11,80]. Od czasu poznania mechanizmu działania pochodnych 6-anilinouracyli (6-AU), większość badań skupiła się na syntezie związków pochodnych i badaniu ich zdolności do hamowania wzrostu mikroorganizmów. Mechanizm działania tych związków polega na współzawodnictwie z dGTP podczas syntezy DNA. Z jednej strony inhibitory te tworzą potrójne wiązanie wodorowe z cytozyną w helisie DNA, z drugiej natomiast – wiążą się w centrum aktywnym enzymu, unieczynniając go w ten sposób [14]. Tarantino i wsp. wykazali przeciwbakteryjne działanie 3-N pochodnych anilinouracyli w stosunku do *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* [69]. W badaniach Daly'ego i wsp. porównano działanie przeciwbakteryjne 3-N pochodnych 6-AU i konwencjonalnych antybiotyków, takich jak klindamycyna, wancomycyna, penicylina G, oksfloksacyna, oksacylina, ryfampina

i in., wobec szpitalnych szczepów *S. aureus*, *E. faecium* oraz *E. faecalis* [14]. Wyniki badań okazały się obiecujące, żaden z badanych szczepów nie wykazywał krzyżowej oporności z cząsteczkami pochodnych 6-AU. Związki te hamowały wzrost mikroorganizmów już w mikromolowym stężeniu, a w stężeniu odpowiadającym dwukrotnej wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC – minimal inhibitory concentration) wykazywały działanie bakteriobójcze przeciw klinicznym izolatom badanych ziarniaków. Jednak dużą wadą 6-AU oraz pochodnych jest ich bardzo mała rozpuszczalność w wodzie oraz biodostępność [53].

Do badania inhibitorów PolC *S. aureus* opracowano wysokoprzepustowy test luminescencyjny [36]. Zasada metody jest tożsama z tą, która znalazła zastosowanie w sekwencjonowaniu drugiej generacji, tzw. pirosekwencjonowaniu (ryc. 4). W dwuetapowej reakcji, najpierw z zastosowaniem sulfurylasy ATP, a następnie lucyferazy, powstający w wyniku polimeryzacji DNA pirofosforan zostaje użyty do wzbudzenia lucyferyny. Po wzbudzeniu białko to emituje strumień fotonów o określonej długości fali, który jest rejestrowany przez odpowiedni detektor. Test może być przydatny do przeszukiwania bibliotek różnych cząsteczek w celu identyfikacji nowych inhibitorów PolC.

Drugim podejściem metodycznym do pomiaru aktywności polimerazy w testach *in vitro* jest monitorowanie przyrostu produktów reakcji przez zastosowanie fluorescencyjnych interkalatorów. Związki te wbudowują się w podwójną helisę powstającego DNA i pozwalają na ilościowe jego oznaczenie. Guiles i wsp. przystosowali eksperyment do płytek wielodołkowych, tworząc wysokoprzepustowy fluorescencyjny test hamowania aktywności białka PolC [28]. W ten sposób przeszukali kolekcję niskocząsteczkowych związków, z których kwazolino-2-ilamino-kwanazolino-4-ole (bischinole) wykazywały działanie hamujące aktywność białka PolC.

Podstawiając w N-pozycję 6-anilinoouracyli cząsteczkę fluorochinolonów, odkryto nową grupę inhibitorów, które wykorzystywały skojarzone działanie obu cząsteczek [11,80]. Jedną z takich cząsteczek hybrydowych, nazwana 21D, wykazywała szeroki zakres działania przeciwko klinicznie izolowanym szczepom bakterii Gram-dodatnich, w tym również szczepów wielolekoopornych. Związek 21D wykazywał 5-15 razy silniejsze działanie bakteriobójcze niż wyjściowa cząsteczka 6-AU. Interesujące jest również to, że związek 21D hamował wzrost bakterii Gram-dodatnich oraz w mniejszym stopniu bakterii Gram-ujemnych. Autorzy uważają, że większy skutek przeciwbakteryjny można będzie uzyskać podstawiając różne cząsteczki fluorochinolonów do cząsteczki 6-AU.

Wyżej opisane metody przesiewowego poszukiwania inhibitorów replikacji pozwalają szybko wyselekcjonować z całej puli dostępnych związków te, które potencjalnie mogą hamować aktywność białek replikacyjnych. Dodatkowo połączenie technik przesiewowych z modelowaniem komputerowym otwiera możliwości w projektowaniu nowych antybiotyków.

## METODY POSZUKIWANIA INHIBITORÓW ZABURZAJĄCYCH ODDZIAŁYWANIA MIĘDZY PODJEDNOSTKAMI REPLISOMU

Replisomy są makrokompleksami, w których oddziaływanie między poszczególnymi elementami jest istotne do utrzymania spójności strukturalnej i funkcjonalnej całej maszyny replikacyjnej. Cząsteczki zaburzające oddziaływania mogą być podstawą nowoczesnej antybiotykoterapii. Największe nadzieje wzbudza zaburzanie oddziaływań między partnerami białek SSB oraz DnaN.

Wysokoprzepustowy test polegający na pomiarze anizotropii fluorescencji [22] pozwolił wyselekcjonować związek nazwany RU7, który zaburzał oddziaływanie β-klamry (dimer białka DnaN) z polimerazą DNA *E. coli* (Pol III). W doświadczeniu wykorzystano krótki peptyd znakowany fluorescencyjnie o sekwencji identycznej z C-końcem Pol III. Wykazano, że związek RU7 zaburza oddziaływanie peptyd-β-klamra przez konkurencję o miejsce wiązania, co powoduje spadek anizotropii fluorescencji w roztworze. DnaN oddziałuje w komórkach bakterii także z polimerazami DNA II i IV. Jednak różny sposób wiązania β-klamry do wszystkich wspomnianych polimeraz przejawia się w różnej sile oddziaływania z nimi. Związek RU7 blokuje replikację zależną od Pol III 5 i 80 razy wydajniej niż syntezę DNA prowadzoną odpowiednio przez Pol III i Pol IV.

Po rozpleceniu podwójnej helisy, DNA jest narażone na uszkodzenia oraz na ponowną lub przypadkową hybrydyzację [42]. Stanowi to poważne zagrożenie dla integralności chromosomu. Ochronę przed uszkodzeniami w miejscach rozplecenia DNA zapewniają białka SSB. Biorą udział w replikacji, rekombinacji oraz naprawie DNA, a także rekrutują do jednoniciowego DNA wiele białek o właściwościach enzymatycznych. Wykazano, że C-końcowa domena białek SSB jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania i oddziaływania z innymi partnerami białkowymi, w tym z egzonukleazą I *E. coli* [41]. W celu identyfikacji inhibitorów tego oddziaływania opracowano test analogiczny do poszukiwania inhibitorów β-klamry. Krótki peptyd stanowiący C-końcowy fragment białka SSB znakowano fluoresceiną i badano dysocjację kompleksu peptyd-egzonukleaza I, co można było obserwować jako zmianę polaryzacji fluorescencji. W technice tej wykorzystano to, że fluorofor wzbudzony przez spolaryzowane światło emituje w różnym stopniu (zależnym od siły wiązania i wielkości cząsteczki) również światło spolaryzowane (FP - fluorescence polarization). Cztery z badanych związków blokowały oddziaływanie między białkiem SSB a egzonukleazą I. Związki te w różnym stopniu zaburzały również oddziaływanie białka SSB z innymi jego znanymi partnerami białkowymi: RecQ (bierze udział w rekombinacji plazmidów oraz naprawie DNA) i PriA (składnik prymosomu) z *E. coli*.

## GYRAZA JAKO CEL DLA ANTYBIOTYKÓW

Od wielu lat głównym celem poszukiwanych leków antibakteryjnych jest gyraza, należąca do grupy topoisomerasz typu II. Jej homologi, powszechne u bakterii i niezbędne do ich przeżycia, nie są obecne u eukariontów. Enzym zbud-

wany z dwóch homodimerów odpowiednio białek GyrA oraz GyrB, jest odpowiedzialny za utrzymywanie odpowiedniego poziomu ujemnego superskręcenia DNA w komórce oraz za usuwanie pozytywnych superskrętów z cząsteczki DNA generowanych miejscowo podczas jej rozplatania. Istnieje dzisiaj wiele testów mających na celu określenie aktywności tego enzymu w obecności potencjalnych inhibitorów. Ze względu na to, że gyraza do swojej aktywności wymaga dostarczenia energii w postaci ATP, część testów opiera się na pomiarze zdolności gyrazy do hydrolizy ATP w sprzężeniu z oksydacją NADH, co jest wykrywane przez oznaczenia kolorymetryczne [8,27]. Przy projektowaniu inhibitorów gyrazy wykorzystuje się również zdolność tego enzymu do przekształcania zrelaksowanego DNA w formę superskręconą [48]. Klasyczna metoda badania aktywności topoizomerozowej polega na określaniu zmian w konformacji DNA spowodowanych przez topoizomerozazy przez rozdzielane różniących się gęstością superhelikalną form topologicznych DNA (topoizomerów) w żelu agarozowym, barwienie żelu fluorescencyjnymi barwnikami, tj. bromek etydyny, a następnie ilościowe oznaczanie intensywności fluorescencji poszczególnych izoform DNA. Jest to jednak podejście wieloetapowe, nie daje możliwości określenia inhibitorów poszczególnych podjednostek gyrazy (GyrA, GyrB) oraz nie pozwala bezpośrednio badać domeny wiążącej ATP.

W celu wykrywania kompetycyjnych inhibitorów gyrazy, a także innych strukturalnie powiązanych topoizomeroz wprowadzono i rozwinięto technikę wykorzystującą polaryzację fluorescencji. W oparciu o krystaliczną strukturę kompleksu GyrB/nowobiocyna zaprojektowano i zsyntetyzowano nowe fluorescencyjne sondy oparte na kowalencyjnym wiązaniu fluoroforu do badanych związków [24]. Dzięki tej metodzie autorzy wyselekcjonowali znane dotąd inhibitory gyrazy przeszukując bibliotekę FDA (Food and Drug Administration), potwierdzając tym samym użyteczność tej techniki w przeszukiwaniach większych bibliotek związków chemicznych w wyniku ich koniugacji z fluoroforem i analizy widma FP.

Znanych jest wiele związków chemicznych o różnych mechanizmach wiązania, hamujących aktywność bakteryjnych gyraz, z czego wiele jest z powodzeniem wykorzystywanych w leczeniu klinicznym. Natomiast nadal nie są znane selektywne inhibitory bakteryjnej topoizomerozazy I, drugiego oprócz gyrazy głównego enzymu dla utrzymania struktury chromosomu. Dzisiaj wiele nadziei wiąże się właśnie z topoizomerozazą I jako celem nowych grup związków chemicznych o własnościach przeciwbakteryjnych [51,67,73].

Rozwiązanie struktury krystalicznej bakteryjnej topoizomerozazy I w kompleksie z DNA [79] stworzyło szansę komputerowego modelowania i dokowania związków chemicznych potencjalnie mogących zaburzać oddziaływanie białka z DNA lub, podobnie jak znane inhibitory gyraz, stabilizować toksyczny dla komórki, kowalencyjny kompleks TopA-DNA. Metody modelowania inhibitorów w oparciu o znane struktury krystaliczne były już wcześniej z powodzeniem stosowane dla topoizomerozazy typu II [61]. Modelowanie komputerowe jest jednak nadal techniką, która nie daje gwarancji na to,

że wytypowany związek będzie rzeczywiście wpływał na aktywność białka, do którego się wiąże. W rzeczywistości tylko niewielki odsetek proponowanych związków chemicznych działa w testach *in vitro* oraz *in vivo*. Mimo pewnych ograniczeń modelowanie komputerowe zawęża grono potencjalnie użytecznych cząsteczek i znacznie obniża koszty ich poszukiwania, redukując potrzebę przeszukiwania ogromnych bibliotek związków chemicznych w klasycznych testach przesiewowych.

#### WYSOKOPRZEPUSTOWE TECHNIKI - NOWE WYZWANIE W POSZUKIWANIU INHIBITORÓW BAKTERYJNYCH TOPOIZOMERAZ

Prowadzenie testów przesiewowych w poszukiwaniu inhibitorów topoizomerozazy wymaga przeprowadzania tysięcy mikroreakcji. Wykorzystanie klasycznych metod w testach przesiewowych jest utrudnione, gdyż odczyt wyniku wymagałby przygotowania setek żeli agarozowych w celu weryfikacji zmian w topologii DNA. Metoda jest mało wydajna, czas- i pracochłonna, a przez to mało praktyczna do zastosowania w zautomatyzowanej wysokoprzepustowej procedurze przesiewowego poszukiwania (HTS - high-throughput screening) dużych bibliotek, zawierających setki tysięcy związków chemicznych.

Jedną z metod opartą na zbliżeniowym teście scyntylicyjnym (SPA - scintillation proximity assay) została wprowadzona do bezpośredniej analizy domeny wiążącej ATP GyrB. W teście tym znakowany izotopem ligand (w tym przypadku [<sup>3</sup>H]dihydronowobiocyna) jest dokowany w kieszeni wiążącej ATP biotynylowanej podjednostki GyrB, która jest unieruchomiona na kulkach SPA pokrytych streptawidyną. Emitowane przez ligand promieniowanie β jest rejestrowane przez detektor promieniowania jonizującego. Inhibitor wiążąc się do podjednostki gyrazy wypiera radioaktywny ligand powodując zmniejszenie wartości odczytu. Technika tę wyróżnia selektywność w stosunku do poszukiwania inhibitorów podjednostki GyrB, a także, w przeciwieństwie do większości standardowych metod, brak konieczności rozdzielania produktów reakcji w żelu agarozowym [23].

W przypadku topoizomerozazy typu I alternatywnym podejściem względem klasycznej metody z wykorzystaniem żeli agarozowych jest fluorometryczny test wykorzystujący różnicę w wiązaniu bromku etydyny lub innych fluorescencyjnych interkalatorów do superskręconego DNA w porównaniu z jego postacią zrelaksowaną [2]. Mimo że technika wydaje się użyteczna w badaniach przesiewowych, to jednak ma pewne ograniczenia. Stosunkowo niski poziom sygnału oraz niewielka różnica odczytu między obiema wyżej wspomnianymi postaciami DNA powodują, że uzyskanie jednoznacznego wyniku może być utrudnione.

Metoda przesiewowego poszukiwania inhibitorów topoizomerozazy (zarówno typu I jak i II) zaproponowana przez Maxwella i wsp. opiera się na zdolności tworzenia kompleksu między cząsteczką plazmidowego DNA i zakotwiczonym oligonukleotydem (ryc. 5) [43]. Kompleks taki jest tworzony efektywniej, gdy plazmid znajduje się w stanie superskręconym. Takie podejście pozwala na monitorowanie topologii

plazmidu bez konieczności rozdzielania jego topologicznych form i ich analizy w żelu agarozowym. Technika była do tej pory testowana w ograniczonym zakresie, jednak pozwoliła na identyfikację związków o charakterze inhibitorów bakteryjnej gyrazy i topoizomerazy VI [70], a zasada metody może być z powodzeniem stosowana do poszukiwań na większą skalę. Metoda opisana przez Shapiro i wsp. oparta jest również na tworzeniu kompleksu, w którym nić oligonukleotydu znakowana jest barwnikiem fluorescencyjnym [58]. Zmiany stosunku zrelaksowanego i superskręconego DNA są określane przez odczyt anizotropii fluorescencji. Przewagą tej metody jest uproszczenie procedury, bowiem oligonukleotyd nie jest unieruchomiony do podłoża. Wadą jest natomiast zapotrzebowanie na duże ilości plazmidu w jednorodnym topologicznym stanie, co pociąga za sobą duże koszty związane z oczyszczaniem plazmidu. Dodatkową trudnością w prawidłowej analizie wyników może być potencjalny wpływ badanych związków na anizotropię fluorescencji.

Stosunkowo prostą i szybką metodą badań przesiewowych, której celem jest identyfikacja cząsteczek skierowanych przeciwko białkom oddziałującym z DNA, w tym również topoizomerazie I jest mikromiareczkowanie wykorzystujące testy ELISA. Jedną z metod polega na wykrywaniu przeciwciał monoklonalnych swoiście wiążących ten enzym. Hamowanie aktywności analizowanych białek przez przeciwciała jest oceniane *in situ* w testach relaksacji DNA, przez dodanie superskręconego DNA bezpośrednio do studzienek płytki, a następnie analizę produktów reakcji w żelu agarozowym [39]. Tego typu badania przeprowadzano z sukcesem m.in. dla topoizomerazy IA pochodzącej z *Mycobacterium smegmatis* [38].

Ciekawą alternatywą dla metod *in vitro* jest poszukiwanie związków wpływających na aktywność topoizomeraz bezpośrednio w żywych komórkach. W metodzie tej wykorzystywany jest gen reporterowy kontrolowany przez promotor wrażliwy na zmiany topologii DNA [3]. Zmiana w poziomie transkrypcji genu reporterowego jest pochodną zmian w aktywności topoizomeraz. Niewątpliwie zaletą tej metody jest analiza nie tylko zdolności danego związku do hamowania aktywności topoizomeraz, ale również jego zdolność do

przenikania bariery, jaką jest błona/ściana komórkowa. Ze względu na to, że enzymów wpływających na topologię DNA i mogących potencjalnie regulować ekspresję genu reporterowego jest kilka, jednoznaczna identyfikacja celu działania odkrytego związku może być utrudniona, co stanowi pewne ograniczenie metody.

## PODSUMOWANIE

Replikacja DNA jest podstawowym procesem w dzielących się komórkach, a jej prawidłowy przebieg zapewnia ciągłość przekazywania informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie. Blokowanie tego procesu wydaje się zatem podstawowym sposobem hamowania namnażania mikroorganizmów, a w przypadku szczepów chorobotwórczych ich zwalczania. Pewne różnice w przebiegu replikacji DNA oraz budowie replisomów między bakteriami i eukariontami pozwalają na swoiste zwalczanie chorobotwórczych bakterii przy jednoczesnym minimalizowaniu niepożądanych skutków dla chorego. W dobie rosnącej lekooporności replikacja chromosomów bakteryjnych jest intensywnie badany proces, a poszukiwanie nowych tarcz terapeutycznych w ostatnich latach staje się priorytetem dla coraz większej liczby zespołów badawczych. Świadczą o tym opracowywanie nowych technik, za pomocą których poszukuje się związków o potencjalnych właściwościach antybiotycznych. Dokładne poznanie mechanizmów replikacji chromosomów bakteryjnych jest nadzieją na znalezienie w przyszłości nowych grup związków chemicznych hamujących ten proces. Połączenie technik wysokoprzepustowych oraz komputerowego modelowania stwarza szansę na jednoczesne przeszukiwanie ogromnej puli związków chemicznych hamujących replikację, a po ich wstępnym wyodrębnieniu, na przewidywanie modyfikacji zwiększających ich efektywność działania, rozpuszczalność oraz zdolność przenikania do komórek.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują dr hab. Dagmarze Jakimowicz i prof. dr hab. Jolancie Zakrzewskiej-Czerwińskiej za dyskusje i cenne uwagi w trakcie pisanja manuskryptu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Adachi T., Mizuuchi M., Robinson E.A., Appella E., O'Dea M.H., Gellert M., Mizuuchi K.: DNA sequence of the E. coli gyrB gene: application of a new sequencing strategy. *Nucleic Acids Res.*, 1987; 15: 771-784
- [2] Andrea J.E., Adachi K., Morgan A.R.: Fluorometric assays for DNA topoisomerases and topoisomerase-targeted drugs: quantitation of catalytic activity and DNA cleavage. *Mol. Pharmacol.*, 1991; 40: 495-501
- [3] Andrews B., Barth P., Mill S., Yang W.: Topoisomerase modulator assays. 55. Patent application WO 2004/087963 A1
- [4] Bailey S., Eliason W.K., Steitz T.A.: Structure of hexameric DnaB helicase and its complex with a domain of DnaG primase. *Science*, 2007; 318: 459-463
- [5] Bergerat A., de Massy B., Gadelle D., Varoutas P.C., Nicolas A., Forterre P.: An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, 1997; 386: 414-417
- [6] Biswas T., Resto-Roldán E., Sawyer S.K., Artsimovitch I., Tsodikov O.V.: A novel non-radioactive primase-pyrophosphatase activity assay and its application to the discovery of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* primase DnaG. *Nucleic Acids Res.*, 2013; 41: e56
- [7] Blinkova A., Hervas C., Stukenberg P.T., Onrust R., O'Donnell M.E., Walker J.R.: The *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme contains both products of the dnaX gene, tau and gamma, but only tau is essential. *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 6018-6027
- [8] Boehm H.J., Boehringer M., Bur D., Gmuender H., Huber W., Klaus W., Kostrewa D., Kuehne H., Luebberts T., Meunier-Keller N., Mueller F.: Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *J. Med. Chem.*, 2000; 43:2664-2674

- [9] Brown P.O., Cozzarelli N.R.: Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981; 78: 843-847
- [10] Browning D.F., Grainger D.C., Busby S.J.: Effects of nucleoid-associated proteins on bacterial chromosome structure and gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2010; 13: 773-780
- [11] Butler M.M., Lamarr W.A., Foster K.A., Barnes M.H., Skow D.J., Lyden P.T., Kustigian L.M., Zhi Ch., Brown N.C., Wright G.E., Bowlin T.L.: Antibacterial activity and mechanism of action of a novel anilinothiazoloquinolone hybrid compound. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007; 51: 119-127
- [12] Calhoun J.H., Murray C.K., Manring M.M.: Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2008; 466: 1356-1362
- [13] Confalonieri F., Elie C., Nadal M., de La Tour C., Forterre P., Duguet M.: Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 4753-4757
- [14] Daly J.S., Giehl T.J., Brown N.C., Zhi C., Wright G.E., Ellison R.T.: In vitro antimicrobial activities of novel anilinothiazoloquinolones which selectively inhibit DNA polymerase III of gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000; 44: 2217-2221
- [15] D'Arpa P., Machlin P.S., Ratrie H., Rothfield N.F., Cleveland D.W., Earnshaw W.C.: cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 2543-2547
- [16] Dervyn E., Suski C., Daniel R., Bruand C., Chapuis J., Errington J., Janniere L., Ehrlich S.D.: Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science*, 2001; 294: 1716-1719
- [17] DiGate R.J., Marians K.J.: Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli* topB, the gene encoding topoisomerase III. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 17924-17930
- [18] Dillon S.C., Dorman C.J.: Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010; 8: 185-195
- [19] Durnford J.M., Champoux J.J.: The DNA untwisting enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 1086-1089
- [20] Falagas M.E., Koletsis P.K., Bliziotis I.A.: The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.*, 2006; 55: 1619-1629
- [21] Fijalkowska I.J., Schaaper R.M., Jonczyk P.: DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012; 36: 1105-1121
- [22] Georgescu R.E., Yurieva O., Kim S.S., Kuriyan J., Kong X.P., O'Donnell M.: Structure of a small-molecule inhibitor of a DNA polymerase sliding clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 11116-11121
- [23] Gevi M., Domenici E.: A scintillation proximity assay amenable for screening and characterization of DNA gyrase B subunit inhibitors. *Anal. Biochem.*, 2002; 300: 34-39
- [24] Glaser B.T., Malerich J.P., Duellman S.J., Fong J., Hutson C., Fine R.M., Keblansky B., Tang M.J., Madrid P.B.: A high-throughput fluorescence polarization assay for inhibitors of gyrase B. *J. Biomol. Screen.*, 2011; 16: 230-238
- [25] Green M., Barner H.D., Cohen S.S.: Studies on the biosynthesis of bacterial and viral pyrimidines. V. Hydrogenation of 5-hydroxymethylpyrimidines. *J. Biol. Chem.*, 1957; 228: 621-631
- [26] Griep M.A., Blood S., Larson M.A., Koepsell S.A., Hinrichs S.H.: Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007; 15: 7203-7208
- [27] Gross C.H., Parsons J.D., Grossman T.H., Charifson P.S., Bellon S., Jernee J., Dwyer M., Chambers S.P., Markland W., Botfield M., Raybuck S.A.: Active-site residues of *Escherichia coli* DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 1037-1046
- [28] Guiles J., Sun X., Critchley I.A., Ochsner U., Tregay M., Stone K., Bertino J., Green L., Sabin R., Dean F., Dallmann H.G., McHenry C.S., Janjic N.: Quinazolin-2-ylamino-quinazolin-4-ols as novel non-nucleoside inhibitors of bacterial DNA polymerase III. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009; 19: 800-802
- [29] Hanai R., Caron P.R., Wang J.C.: Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 3653-3657
- [30] Hardy C.D., Cozzarelli N.R.: Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 941-947
- [31] Herendeen D.R., Kelly T.J.: DNA polymerase III: running rings around the fork. *Cell*, 1996; 84: 5-8
- [32] Jenkins J.R., Ayton P., Jones T., Davies S.L., Simmons D.L., Harris A.L., Sheer D., Hickson I.D.: Isolation of cDNA clones encoding the beta isozyme of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acids Res.*, 1992; 20: 5587-5592
- [33] Kato J., Nishimura Y., Imamura R., Niki H., Hiraga S., Suzuki H.: New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, 1990; 63: 393-404
- [34] Khann S., Mao E.T., Rajendra Y.P., Satyanarayana S., Nagaraja S.B., Kumar A.M.: Linkage of presumptive multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB) patients to diagnostic and treatment services in Cambodia. *PLoS One*, 2013; 8: e59903
- [35] Kornberg A., Baker T.A.: The DNA replication. Second edition. W.H. Freeman & Co, New York 1992
- [36] Kuhl A., Svenstrup N., Ladel C., Otteneder M., Binas A., Schiffer G., Brands M., Lampe T., Ziegelbauer K., Rubsamen-Waigmann H., Haebich D., Ehler K.: Biological characterization of novel inhibitors of the gram-positive DNA polymerase III C enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005; 49: 987-995
- [37] Laginha K.M., Verwoert S., Charrois G.J., Allen T.M.: Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 6944-6949
- [38] Leelaram M.N., Bhat A.G., Suneetha N., Nagaraja V., Manjunath R.: Immunological cross-reactivity of mycobacterial topoisomerase I and divergence from other bacteria. *Tuberc. Edinb. Scotl.*; 2009; 89: 256-262
- [39] Leelaram M.N., Suneetha N., Nagaraja V., Manjunath R.: A new ELISA plate based microtiter well assay for mycobacterial topoisomerase I for the direct screening of enzyme inhibitory monoclonal antibody supernatants. *J. Immunol. Methods*, 2010; 357: 26-32
- [40] López de Saro F.J., O'Donnell M.: Interaction of the beta sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8376-8380
- [41] Lu D., Bernstein D.A., Satyshur K.A., Keck J.L.: Small-molecule tools for dissecting the roles of SSB/protein interactions in genome maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 633-638
- [42] Lu D., Windsor M.A., Gellman S.H., Keck J.L.: Peptide inhibitors identify roles for SSB C-terminal residues in SSB/exonuclease I complex formation. *Biochemistry (Mosc)*, 2009; 48: 6764-6771
- [43] Maxwell A., Burton N.P., O'Hagan N.: High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: e104
- [44] McGlynn P., Lloyd R.G.: Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002; 3: 859-870

- [45] McHenry C.S.: DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: components and function of a true replicative complex. *Mol. Cell. Biochem.*, 1985; 66: 71-85
- [46] McKay G.A., Reddy R., Arhin F., Belley A., Lehoux D., Moeck G., Sarmiento I., Parr T.R., Gros P., Pelletier J., Far A.R.: Triaminotriazine DNA helicase inhibitors with antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006; 16: 1286-1290
- [47] Messer W., Meijer M., Bergmans H.E., Hansen F.G., von Meyenburg K., Beck E., Schaller H.: Origin of replication, *oriC*, of the *Escherichia coli* K12 chromosome: nucleotide sequence. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1979; 43: 139-145
- [48] Moir D.T., Ming Di., Opperman T., Schweizer H.P., Bowlin T.L.: A high-throughput, homogeneous, bioluminescent assay for *Pseudomonas aeruginosa* gyrase inhibitors and other DNA-damaging agents. *J. Biomol. Screen*, 2007; 12: 855-864
- [49] Morais Cabral J.H., Jackson A.P., Smith C.V., Shikotra N., Maxwell A., Liddington R.C.: Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, 1997; 388: 903-906
- [50] Nordmann P., Cuzon G., Naas T.: The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.*, 2009; 9: 228-236
- [51] Pommier Y.: Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol.*, 2013; 8: 82-95
- [52] Reyes-Lamothe R., Sherratt D.J., Leake M.C.: Stoichiometry and architecture of active DNA replication machinery in *Escherichia coli*. *Science*, 2010; 328: 498-501
- [53] Robinson A., Causer R.J., Dixon N.E.: Architecture and conservation of the bacterial DNA replication machinery, an underexploited drug target. *Curr. Drug Targets*, 2012; 13: 352-372
- [54] Rothenberg M.L.: Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann. Oncol.*, 1997; 8: 837-855
- [55] Scherzinger E., Haring V., Lurz R., Otto S.: Plasmid RSF1010 DNA replication in vitro promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. *Nucleic Acids Res.*, 1991; 19: 1203-1211
- [56] Seville M., West A.B., Cull M.G., McHenry C.S.: Fluorometric assay for DNA polymerases and reverse transcriptase. *BioTechniques*, 1996; 21: 664-672
- [57] Shakya N., Srivastav N.C., Bhavanam S., Tse C., Desroches N., Agrawal B., Kunimoto D.Y., Kumar R.: Discovery of novel 5-(ethyl or hydroxymethyl) analogs of 2'-up' fluoro (or hydroxyl) pyrimidine nucleosides as a new class of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012; 20: 4088-4097
- [58] Shapiro A., Jahic H., Prasad S., Ehmann D., Thresher J., Gao N., Hajec L.: A homogeneous, high-throughput fluorescence anisotropy-based DNA supercoiling assay. *J. Biomol. Screen*, 2010; 15: 1088-1098
- [59] Shereda R.D., Kozlov A.G., Lohman T.M., Cox M.M., Keck J.L.: SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2008; 43: 289-318
- [60] Shuman S., Moss B.: Identification of a vaccinia virus gene encoding a type I DNA topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 7478-7482
- [61] Siwek A., Stączek P., Stefańska J.: Synthesis and structure-activity relationship studies of 4-arylthiosemicarbazides as topoisomerase IV inhibitors with Gram-positive antibacterial activity. Search for molecular basis of antibacterial activity of thiosemicarbazides. *Eur. J. Med. Chem.*, 2011; 46: 5717-5726
- [62] Slesarev A.I., Lake J.A., Stetter K.O., Gellert M., Kozyavkin S.A.: Purification and characterization of DNA topoisomerase V. An enzyme from the hyperthermophilic prokaryote *Methanopyrus kandleri* that resembles eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 3295-3303
- [63] Srivastav N.C., Shakya N., Bhavanam S., Agrawal A., Tse C., Desroches N., Kunimoto D.Y., Kumar R.: Antimycobacterial activities of 5-alkyl (or halo)-3'-substituted pyrimidine nucleoside analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012; 22: 1091-1094
- [64] Stavans J., Oppenheim A.: DNA-protein interactions and bacterial chromosome architecture. *Phys. Biol.*, 2006; 3: 1-10
- [65] Stillman B.: Cell cycle control of DNA replication. *Science*, 1996; 274: 1659-1664
- [66] Swanberg S.L., Wang J.C.: Cloning and sequencing of the *Escherichia coli* *gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. *J. Mol. Biol.*, 1987; 197: 729-736
- [67] Szafran M., Zakrzewska-Czerwińska J., Jakimowicz D.: Bakteryjne topoizomeryzy typu I - rola biologiczna i zastosowanie jako potencjalnych celów dla antybiotyków. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 67: 130-142
- [68] Taft-Benz S.A., Schaaper R.M.: The theta subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III: a role in stabilizing the epsilon proofreading subunit. *J. Bacteriol.*, 2004; 186: 2774-2780
- [69] Tarantino P.M., Zhi C., Wright G.E., Brown N.C.: Inhibitors of DNA polymerase III as novel antimicrobial agents against gram-positive eubacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; 43: 1982-1987
- [70] Taylor J.A., Mitchenall L.A., Rejzek M., Field R.A., Maxwell A.: Application of a novel microtitre plate-based assay for the discovery of new inhibitors of DNA gyrase and DNA topoisomerase VI. *PLoS One*, 2013; 8: e58010
- [71] Topcu Z.: DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 2001; 26: 405-416
- [72] Tsai-Pflugfelder M., Liu L.F., Liu A.A., Tewey K.M., Whang-Peng J., Knutsen T., Huebner K., Croce C., Wang J.C.: Cloning and sequencing of cDNA encoding human DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 7177-7181
- [73] Tse-Dinh Y.C.: Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 731-737
- [74] Tse-Dinh Y.C., Wang J.C.: Complete nucleotide sequence of the *topA* gene encoding *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Mol. Biol.*, 1986; 191: 321-331
- [75] Waga S., Stillman B.: The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998; 67: 721-751
- [76] Wallis J.W., Chrebet G., Brodsky G., Rolfe M., Rothstein R.: A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell*, 1989; 58: 409-419
- [77] Xu H., Ziegelin G., Schröder W., Frank J., Ayora S., Alonso J.C., Lanka E., Saenger W.: Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic Acids Res.*, 2001; 29: 5058-5066
- [78] Zhang Y., Yang F., Kao Y.C., Kurilla M.G., Pompliano D.L., Dicker I.B.: Homogenous assays for *Escherichia coli* DnaB-stimulated DnaG primase and DnaB helicase and their use in screening for chemical inhibitors. *Anal. Biochem.*, 2002; 304: 174-179
- [79] Zhang Z., Cheng B., Tse-Dinh Y.C.: Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 6939-6944
- [80] Zhi C., Long Z.Y., Manikowski A., Comstock J., Xu W.C., Brown N.C., Tarantino P.M., Holm K.A., Dix E.J., Wright G.E.: Hybrid antibacterials. DNA polymerase-topoisomerase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2006; 49: 1455-1465

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.