

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu**

**Wydział Biologii**

**Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii**

**Praca Doktorska**

„Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.”

**Autor:**

**Łukasz Kościński**

**Promotor pracy:**

**Prof. dr hab. Janusz M. Bujnicki**

*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*

*Dziękuję mojemu promotorowi  
prof. dr hab. Januszowi Bujnickiemu  
za kierowanie i opiekę  
nad moim projektem doktorskim  
oraz pomoc podczas pisania niniejszej pracy*

*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*

*Składam serdeczne podziękowania  
za owocną współpracę  
Panu dr hab. Tadeuszowi Kulińskiemu  
i Pani dr Joannie Sarzyńskiej*

*a także fachową, koleżeńską pomoc  
w prawach naukowych i przy redagowaniu tej rozprawy  
Annie Czerwonic  
Marcinowi Federowi  
oraz Irinie Tuszyńskiej*

*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*

*Dziękuję także moim Rodzicom  
oraz bliskim, za niezłomną wiarę  
w powodzenie mojego doktoratu*

# Spis treści

1. Cel pracy.....	6
2. Wstęp.....	7
2.1. Antybiotyki .....	7
2.2. Makrolidy.....	9
2.2.1. Rybosom jako cel dla makrolidów .....	11
2.2.2. Działanie makrolidów .....	13
2.2.3. Zastosowania makrolidów .....	15
2.3. Mechanizmy oporności na makrolidy.....	16
2.4. Metylotransferazy .....	19
2.4.1. Metylotransferaza ErmC' .....	20
2.4.1.1. Mechanizm reakcji przeprowadzanej przez ErmC' .....	20
2.4.1.2. Wymagania odnośnie substratu dla ErmC' .....	21
2.4.1.3. Budowa ErmC' .....	23
2.4.2. Metylotransferazy RlmA.....	30
2.5. Aminoglikozydy i metylotransferazy z rodziny Kam.....	33
3. Metody.....	37
3.1. Dynamika molekularna.....	37
3.2. Dokowanie mikromolekularne .....	48
3.3. Dokowanie makromolekularne.....	55
3.4. Analiza sekwencji .....	59
3.5. Modelowanie homologiczne.....	60
3.6. Modelowanie pętli metodą ROSETTA.....	63
3.7. Modelowanie struktur kwasów nukleinowych metodą MCSym.....	63
3.8. Programy do wizualizacji .....	64
4. Wyniki .....	65
4.1. Metylotransferazy modyfikujące 23S rRNA .....	65
4.1.1. Metylotransferaza ErmC' modyfikująca N6 w A2058 z 23S rRNA.....	65
4.1.1.1. Minimalny substrat RNA dla ErmC' .....	65
4.1.1.2. Analiza białka ErmC' .....	67
4.1.1.3. Analiza kompleksu ErmC'-RNA.....	75
4.1.1.4. Poszukiwanie inhibitorów białka ErmC' .....	81
4.1.2. Metylotransferazy z rodziny RlmA.....	84
4.1.2.1. Metylotransferaza RlmA(I) katalizująca metylację N1 G745.....	84
4.1.2.2. Metylotransferaza RlmA(II) katalizująca metylację N1 G748 .....	90
4.2. Metylotransferazy przeprowadzające modyfikację m1A w 16S rRNA.....	98
4.2.1. Metylotransferaza KamB modyfikująca N1 w A1408.....	98
4.2.2. Metylotransferaza NpmA modyfikująca N1 w A1408.....	100
4.2.2.1. Analiza sekwencji i struktury enzymu NpmA.....	100
4.2.2.2. Dokowanie enzymu NpmA do rybosomu .....	104
4.2.2.3. Poszukiwanie inhibitorów metylotransferazy NpmA .....	106
5. Dyskusja .....	107
6. Literatura .....	111

# 1. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była teoretyczna analiza interakcji bakteryjnych metylotransferaz RNA z ich substratami i kofaktorami. Badanie to miało pozwolić na ustalenie kluczowych dla interakcji ww. cząsteczek reszt aminokwasowych oraz nukleotydów, aby następnie blokować je opisywanymi niżej inhibitorami. Niektóre z tych enzymów są odpowiedzialne za bakteryjną oporność na antybiotyki MLS<sub>B</sub>, tylozynę lub aminoglikozydy, powodowaną przez metylację RNA w miejscu wiązania cząsteczki danego antybiotyku. W ramach niniejszej pracy zbadano kilka wybranych grup metylotransferaz RNA:

- metylotransferazy Erm wprowadzające modyfikację m<sup>6</sup>A2058 lub m<sup>6,6</sup>A2058 w 23S rRNA i odpowiedzialne za oporność bakterii na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>,
- metylotransferazy Rlm wprowadzające modyfikację m<sup>1</sup>G745 lub m<sup>1</sup>G748 w 23S rRNA i odpowiedzialne za oporność bakteryjną na tylozynę,
- metylotransferazy Kam wprowadzające modyfikację m<sup>1</sup>A1408 w 16S rRNA i odpowiedzialne za oporność bakterii na aminoglikozydy.

Dalszym celem, po analizie interakcji, było poszukiwanie potencjalnych inhibitorów poszczególnych metylotransferaz, które mogłyby znieść bakteryjną oporność na antybiotyki powodowaną przez ww. enzymy.

## 2. Wstęp

### 2.1. Antybiotyki

Infekcje bakteryjne są wielkim problemem trapiącym ludzkość. Takie choroby jak dżuma (wywoływana przez *Yersinia pestis*) czy cholera (*Vibrio cholerae*) były swego czasu jednymi z najgroźniejszych chorób zakaźnych [1, 2]. Również bakterie z rodzaju *Mycobacterium* są odpowiedzialne za wiele ludzkich chorób m.in. trąd (wywoływany przez *M. leprae*) czy gruźlicę (wywoływaną przez *M. tuberculosis*) [3, 4]. Z kolei *Helicobacter pylori* to bakteria kolonizująca ludzki układ pokarmowy, powodująca wrzody oraz nieżyt żołądka, a także przyczyniająca się do rozwoju raka żołądka [5]. *Streptococcus pneumoniae*, Gram-dodatnia bakteria tlenowa powoduje zachorowania na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u małych dzieci a u dorosłych prowadzi może ponadto do zapalenia stawów czy otrzewnej. Powszechnym problemem są Gram-dodatnie bakterie *Staphylococcus aureus*. Występują one w jamie nosowo-gardłowej oraz skórze ludzi i zwierząt [6]. Ich nosicielstwo u personelu medycznego ma duży wpływ na częste zakażenia szpitalne.

Pojęcie „antybiotyk” zostało wprowadzone przez Waksmana [7]. Określa się nim związek wytwarzany przez mikroorganizmy i mający wpływ na inne drobnoustroje przez hamowanie ich procesu namnażania się, bądź też przez ich bezpośrednie zabijanie. Produkowane są również antybiotyki półsyntetyczne bazujące na naturalnych oraz w pełni syntetyczne.

Początki antybiotyków sięgają 1929 roku, kiedy Aleksander Fleming zaobserwował, że grzyb *Penicillium notarium* wpływa hamująco na wzrost bakterii *Streptococcus* [8]. Mimo, że penicylina została uznana za cudowny lek, już sam jej odkrywca przestrzegał, przed nadmiernym stosowaniem jej w praktyce medycznej. Jego sugestia nie została niestety wzięta pod uwagę przez lekarzy ani w przypadku penicyliny, ani innych antybiotyków, co z kolei doprowadziło do licznych przypadków wytworzenia przez bakterie oporności na te leki.

W obecnych czasach dużym problemem jest uodparnianie się bakterii na antybiotyki, przez co coraz większa grupa leków staje się bezużyteczna w walce z opornymi szczepami bakterii. Oporność mikroorganizmów na antybiotyki jest zjawiskiem

obserwowanym od połowy wieku, jednak w ciągu ostatnich kilkunastu lat odnotowano jego znaczne nasilenie, zwłaszcza w przypadku szczepów patogennych.

Coraz częściej terapie infekcji bakteryjnych antybiotykami, które dotychczas były stosowane rutynowo są nieskuteczne. Nawet pomimo znacznego rozszerzenia repertuaru dostępnych antybiotyków, aktualna sytuacja epidemiologiczna w zakresie lekooporności wielu grup patogenów uległa drastycznemu pogorszeniu. Co więcej, niepokojąco zwiększa się liczba izolowanych szczepów posiadających jednocześnie determinanty oporności na kilka głównych klas antybiotyków. W takiej sytuacji niezwykle ważnym zadaniem dla współczesnej medycyny staje się z jednej strony zracjonalizowanie wykorzystywania dostępnych antybiotyków tak, aby zminimalizować procesy rozpowszechniania się genów oporności, a z drugiej odbudowanie szerokiego repertuaru skutecznych leków antibakteryjnych, umożliwiających terapię zakażeń szczepami wieloopornymi.

Istnieje kilka głównych mechanizmów wytwarzania oporności na antybiotyki u bakterii [9-12]. Zaliczamy do nich m.in.:

- inaktywację antybiotyku przez enzymy modyfikujące cząsteczki antybiotyków. Przykładem inaktywacji antybiotyku przez jego rozkład są penicylinyza zaobserwowane u *S. aureus*. Hydrolizują one wiązania amidowe w penicylinach. Antybiotyk może też być inaktywowany przez modyfikację chemiczną cząsteczki antybiotyku (np. fosforylację), przez co zmienione zostają jego właściwości i nie wiąże się on do swojego celu (np. oporność na aminoglikozydy u *E. coli*);
- związanie antybiotyku przez białko bakteryjne (np. penicylin przez odporne szczepy *S. aureus*);
- pompy białkowe usuwające antybiotyk z komórki bakteryjnej (np. usuwanie tetracyklin z *E. coli*);
- modyfikację docelowego miejsca działania antybiotyku – sprawiającą, że antybiotyk jest niezdolny do rozpoznania celu i tym samym nieskuteczny. To na tym mechanizmie skupia się niniejsza praca, a konkretnie na enzymach modyfikujących rybosomalne RNA w celu uzyskania oporności.

Modyfikacja 23S rRNA związana z opornością na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub> (grupa antybiotyków makrolidy-linkosamidy-streptogramina B - szerzej omówiona w dalszej części pracy) została po raz pierwszy zaobserwowana w badaniach nad *Streptococcus* oraz

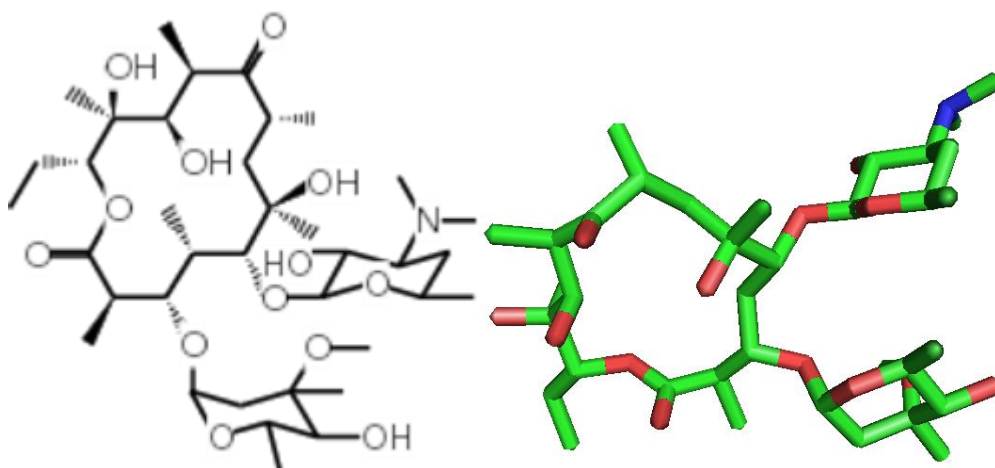
*Staphylococcus* [13]. Streptokoki wykazują również powszechną oporność na penicylinę oraz tetracykliny. Natomiast u stafylokoków stwierdzono oporność na aminoglikozydy [9].

Oporność na antybiotyki oddziałujące na rybosom jest nabywana przez szczepy patogenne głównie poprzez mechanizm transferu horyzontalnego plazmidów (cząsteczek DNA występujących w komórce poza chromosomem i zdolnych do autonomicznej replikacji) ze szczepów uodpornionych do szczepów nie posiadających odporności na dany antybiotyk. Istnieją także przypadki, gdzie oporność pojawia się jako efekt spontanicznej mutacji w rRNA.

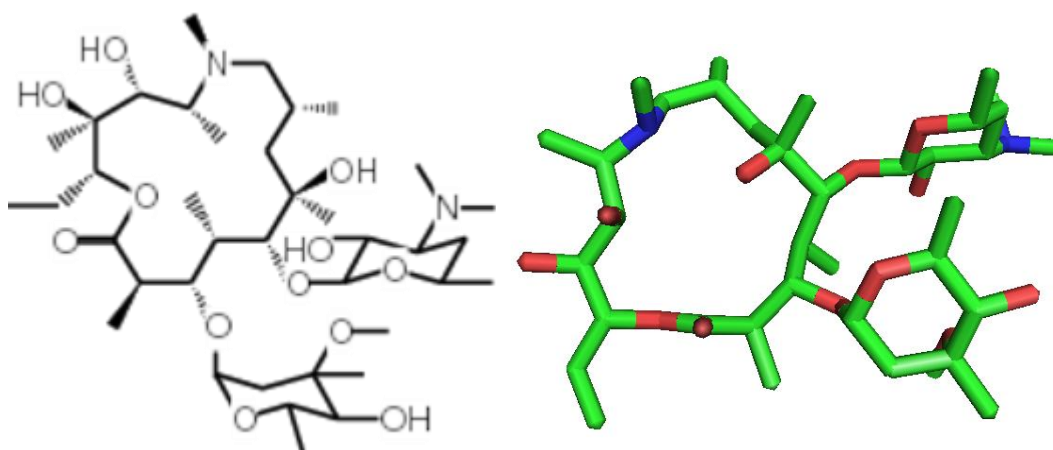
## **2.2. Makrolidy**

Makrolidy to antybiotyki o działaniu bakteriostatycznym. Ich nazwa wywodzi się ze słów „makro” (duży) i „oligo” (lakton), ponieważ cząsteczki tych antybiotyków mają 12-16 atomowy rdzeń laktonowy. Najczęściej wykorzystywane klinicznie są makrolidy zawierające 14-, 15- oraz 16-członowy pierścień laktonowy podstawiony zazwyczaj dwoma lub więcej cukrami. Przykłady niektórych makrolidów oraz ketolidów zostały przedstawione na Ryc.1. Zobrazowane zostały również przykładowe antybiotyki z pozostałych członków grupy MLS<sub>B</sub> tj. linkozamidów oraz streptogramin (Ryc.2). Makrolidy z 14-członowym pierścieniem laktonowym (m.in. erytromycyna) zawierają 3 podstawowe elementy strukturalne, tj.: pierścień laktonowy oraz reszty cukrowe dezozaminy i kladynozy. Azytromycyna ma 15-członowy pierścień, powstały w wyniku włączenia do pierścienia laktonowego erytromycyny grupy aminowej. Najnowszym rodzajem stosowanych makrolidów są ketolidy, które zamiast bocznego pierścienia aromatycznego zawierają grupę ketonową przy węglu C3, a pozycje 11 oraz 12 połączone zostały w pierścień heterocykliczny [14]. Celem działania antybiotyków makrolidowych jest rybosom bakteryjny omawiany w kolejnym podrozdziale.

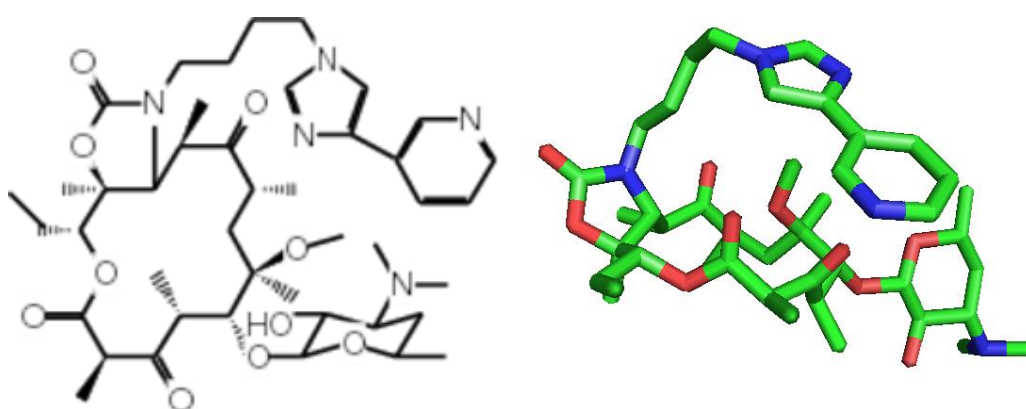
A



B

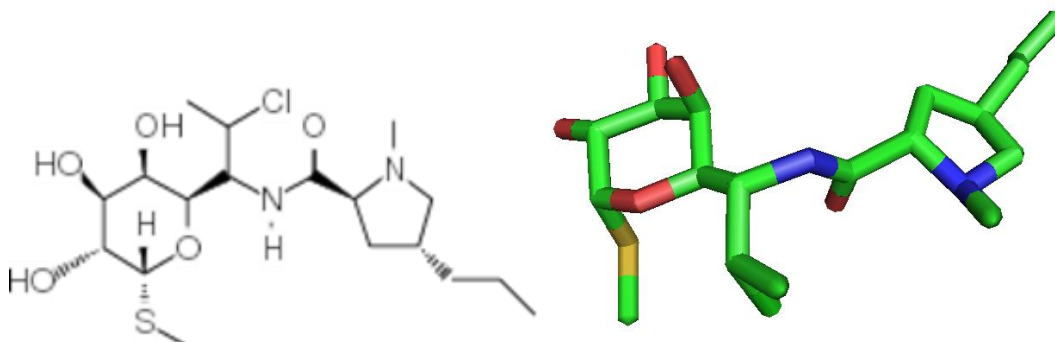


C

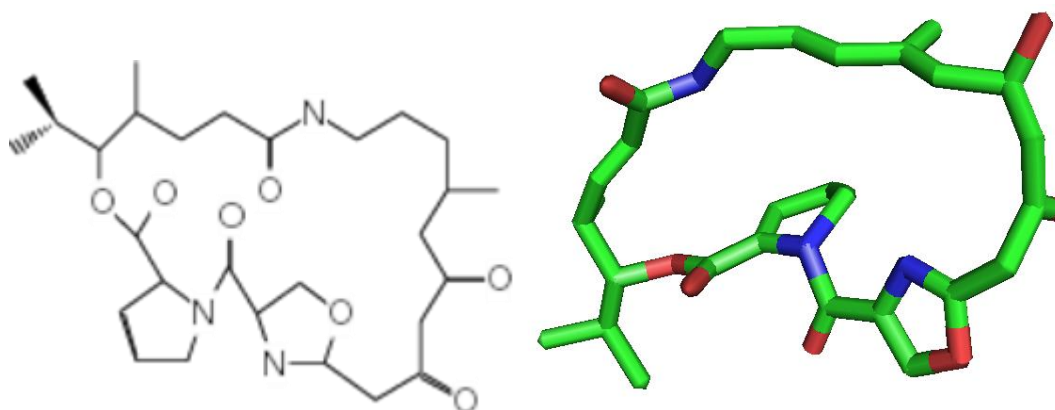


Ryc. 1 Od góry Erytromycyna (A) jako przykład makrolidu z 14-członowym pierścieniem laktonowym, azytromycyna (B) – makrolid zawierający pierścień 15-członowy oraz telytromycyna (C) – jako przykład ketolidu.

A



B



Ryc.2 Od góry – klindamycyna jako przedstawiciel linkozamidów oraz virginiamycyna M jako lek z grupy streptogramin B.

### 2.2.1. Rybosom jako cel dla makrolidów

Rybosom jest makromolekularnym kompleksem, który przepisuje informację zakodowaną w mRNA na białka [15]. Proces ten jest kluczowy dla wszystkich żyjących komórek i to właśnie rybosom bakteryjny jest celem wielu antybiotyków [15]. Różnice w budowie rybosomów prokariotów i eukariotów są podstawą stosowania antybiotyków, gdyż blokują translację tylko u tych pierwszych. Dzięki temu można stosować antybiotyki bez ryzyka, że zablokują one translację w ludzkim rybosomie.

Rybosom u prokariotów składa się z dwóch podjednostek: 30S oraz 50S, o różnych współczynnikach sedymentacji. Mniejsza podjednostka (30S) złożona jest

z 16S rRNA oraz około 20 białek rybosomalnych (oznaczanych S1-S20). Z kolei duża podjednostka (50S) składa się z dwóch cząsteczek rRNA: 5S oraz 23S, a także z ponad 30 białek rybosomalnych (oznaczanych L1-L36) [16].

Każda z podjednostek rybosomu pełni określoną funkcję podczas syntezy białek. Mała oddziałuje z mRNA i odczytuje informację genetyczną. Duża podjednostka zawiera m.in. transferazę peptydylową, która katalizuje tworzenie wiązania peptydowego między kolejnymi aminokwasami w tworzonym łańcuchu polipeptydowym [17]. W miejscu styku podjednostek znajdują się miejsca przyłączenia tRNA E, P oraz A, odpowiadające za przebieg translacji. W miejscu P zaczyna się translacja od związania kodonu startowego (najczęściej AUG) w mRNA. Do miejsca A, w którym w trakcie translacji znajduje się kolejny kodon mRNA, przyłączane są komplementarne antykodony tRNA związane z odpowiadającymi kodonowi aminokwasami. tRNA w miejscu P i A są położone tak blisko siebie, że pozwalają na utworzenie wiązania peptydowego między położonymi w nich resztami aminokwasowymi. Łańcuch mRNA przesuwa się z miejsca P do E oraz z A do P. Dzięki temu tRNA z miejsca E jest uwalniane, a do miejsca A wiąże się kolejne tRNA z aminokwasem. Po udanym dodaniu każdego kolejnego aminokwasu, łańcuch peptydowy jest przesuwany przez tunel nad miejscem P prowadzący na zewnątrz dużej podjednostki. Translacja kończy się wraz z napotkaniem kodonu STOP, który powoduje terminację procesu, uwolnienie wytworzonego białka oraz rozdzielenie się podjednostek rybosomu.

Wraz ze wzrostem możliwości metod związanych z badaniem struktur biocząsteczek (głównie krystalografii rentgenowskiej oraz NMR) w ostatnich latach znacznie zwiększyła się liczba dostępnych struktur rybosomów bakteryjnych. W chwili obecnej metody krystalograficzne dają możliwość badania struktury tych makromolekuł z rozdzielczością nieco powyżej 2 Å [18].

Rybosom bakteryjny jest celem dla bardzo wielu antybiotyków. Na przykład do podjednostki 16S rRNA z 30S wiążą się: tetracykliny, paktamycyna oraz liczne aminoglikozydy (np. streptomycyna, paromycyna, apramycyna) [19, 20]. Do podjednostki 50S w 23S rRNA antybiotyki wiążą się głównie w centrum aktywnym transferazy peptydylowej [21]. W ww. centrum wiążą się m.in. omawiane w niniejszej pracy antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub> [22].

Tabela 1. Wybrane struktury antybiotyków z grupy MLS<sub>B</sub> związane do rybosomów.

Organizm	Typ związanego antybiotyku	Nazwa antybiotyku	Kod PDB	Cytowanie
duża podjednostka <i>Deinococcus radiodurans</i>	makrolid	erytromycyna	1JZY	[23]
		telytromycyna	1P9X	[14]
	linkozamid	klindamycyna	1JZX	[23]
	streptogramina	dalfoprystyna	1SM1	[24]
		kwinuprystyna	1SM1	[24]
duża podjednostka <i>Haloarcula marismortui</i>	makrolid	azytromycyna	1M1K	[25]
		karbomycyna A	1K8A	[26]
		spiramycyna	1KD1	[27]
		tylozyna	1K9M	[28]
	streptogramina	virginiamycyna M	1YIT	[22,26]

Wspomniane struktury dały możliwość obserwacji specyfiki wiązania się poszczególnych antybiotyków do różnych rybosomów, umożliwiając tym samym dalsze badanie oporności bakterii na antybiotyki.

### 2.2.2. Działanie makrolidów

Działanie makrolidów polega na związaniu się z podjednostką 50S rybosomu bakterii i unieczynnieniem rRNA, powodującym przedwczesne zakończenie syntezy łańcucha peptydowego (zahamowanie translacji peptydylotransferazy) [27].

Zaobserwowano, że miejscem wiązania się antybiotyków z grupy makrolidów jest głęboka bruzda w dużej podjednostce rybosomu bakteryjnego, znajdująca się blisko tunelu wyjściowego dla tworzonych łańcuchów peptydowych [28, 29].

Istotną specyfiką działania makrolidów jest to, że wiążą się one we wspomnianej bruzdzie do adenozyliny A2058 (numeracja *Escherichia coli*) [30], konserwowanej wśród prokariotów [31]. Modyfikacja tego nukleotydu powoduje utratę powinowactwa antybiotyków MLS<sub>B</sub> do miejsca wiązania, co omawiane jest szerzej w dalszej części pracy. Natomiast u eukariotów w miejscu tym znajduje się guanozyna, co sprawia, że makrolidy nie hamują u tych organizmów translacji i nie są toksyczne dla ludzi.

Związany makrolid bezpośrednio nie blokuje syntezy białka, ale uniemożliwia rozbudowę łańcucha peptydowego tak, że po syntezie kilku aminokwasów tworzony łańcuch

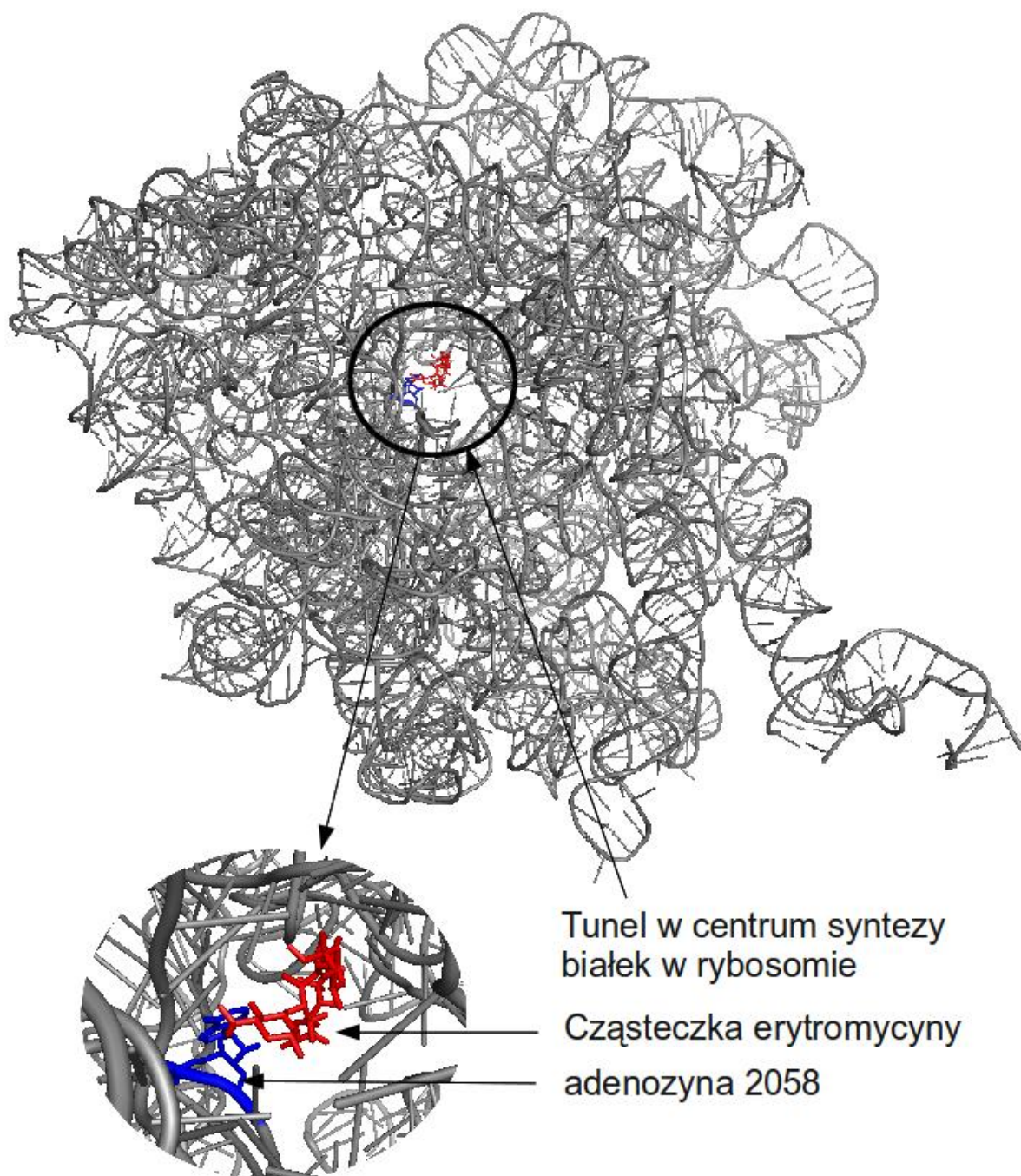
nie ma dokąd się przesunąć i translacja ulega zahamowaniu. W przypadku obecności makrolidów z pierścieniem 14- oraz 15-członowym rybosomy bakteryjne są nadal zdolne do produkcji krótkich peptydów [30]. W kryształach rybosomów bez związanych antybiotyków z grupy makrolidów zasada A2103/A2062 (*H. marismortui*/*E. coli*) jest równoległa do ściany tunelu. Natomiast w obecności makrolidów z pierścieniem 16-członowym ww. zasada dokonuje reorientacji o niemal 90 stopni, blokując wejście do tunelu [31]. Makrolidy, wiążąc się w tunelu, kierują pierścień laktonowy (hydrofobowy) do środka tunelu, eksponując część hydrofilową na zewnątrz [30].

Jako przykład mechanizmu działania antybiotyków z grupy MLS<sub>B</sub> posłużą makrolidy z pierścieniem 14-członowym. Jak zostało wspomniane w poprzednim podrozdziale zawierają one trzy podstawowe elementy strukturalne: pierścień laktonowy i reszty cukrowe dezozaminy i kladynozy. Reaktywne grupy dezozaminy oraz pierścienia laktonowego pośredniczą w tworzeniu wiązań wodorowych makrolidów z centrum transferazy peptydylowej. Grupa 2'OH dezozaminy tworzy wiązania wodorowe z trzema atomami cząsteczki rRNA: N6 i N1 w A2058 oraz z N6 w A2059. Na rycinie 3 zobrazowana jest erytromycyna związana do rybosomu bakteryjnego na dnie tunelu, przez który uwalniane są białka. Mimo pewnych drobnych różnic strukturalnych względem siebie makrolidy wiążą się do rRNA w podobny sposób.

Ketolidy wykazują wyższe powinowactwo do rybosomu bakteryjnego od klasycznych makrolidów, co wynika m.in. z tego, że oprócz interakcji z A2058, wiążą się z helisą 35 występującą w domenie II w 23S rRNA [32-34]. Z faktu tego widać wyraźnie, że domeny II oraz V położone są w przestrzeni trójwymiarowej blisko siebie. W porównaniu z siłą wiązania się erytromycyny do 23S rRNA [23], wiązanie się tetyromycyny jest mniej utrudnione w przypadku modyfikacji A2058 właśnie ze względu na dodatkowe interakcje z domeną II 23S rRNA [35].

Linkozamid - klindamycyna wiąże się na dnie tunelu wzdłuż jego osi. Jeżeli zaś chodzi o antybiotyki streptograminowe, to na przykład virginiamycyna M wiąże się na początku tunelu (miejsca A oraz P) [36, 37].

Bliskość położenia fragmentów II oraz V domeny 23S rRNA, a także relatywnie nieduży rozmiar antybiotyków z grupy makrolidów w porównaniu do cząsteczki rybosomu sugeruje, iż antybiotyk działa na już złożonej strukturze rybosomu [38].



Ryc. 3 Erytromycyna związana w środku 23S rRNA w rybosomie *E. coli* [39].

### 2.2.3. Zastosowania makrolidów

W praktyce klinicznej makrolidy stanowią niezwykle cenną grupę antybiotyków ze względu na szerokie spektrum przeciwbakteryjne, niewielką liczbę działań niepożądanych oraz wygodne dawkowanie. Antybiotyki makrolidowe są stosowane m.in. jako leki

pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń dróg oddechowych, skóry i tkanek miękkich [40, 41]. Makrolidy charakteryzują się doskonałą penetracją do wnętrza komórek, a obok aktywności przeciwbakteryjnej wykazują również działanie przeciwzapalne [42].

Makrolidy są bardzo dobrze tolerowaną przez organizm grupą antybiotyków [43]. Są one naturalnym produktem metabolizmu szczepów bakterii z grupy *actinomycete* [44]. Przykładem może być erytromycyna A, która została wprowadzona klinicznie w 1953 roku. Jest ona pierwszym stosowanym antybiotykiem z grupy makrolidów. Jej naturalnym producentem jest *Streptomyces erythraeus* [45]. Erytromycyna A zawiera 14-elementowy pierścień aromatyczny.

Tetytromycyna jest pierwszym z ketolidów zatwierdzonym do użytku klinicznego [46], a przepisywanym w leczeniu infekcji oddechowych powodowanych przez patogeny *Streptococcus* [47]. Są one skuteczniejsze od klasycznych makrolidów przy infekcjach powodowanych przez bakterie Gram-dodatnie. Niemniej odnotowano już przypadki szczepów opornych, m.in. *S. aureus*. Można zatem przyjąć, że pojawienie się oporności w przypadku ketolidów jest kwestią czasu. Monometylacja nukleotydu A2058 wpływa w niewielkim stopniu na działanie tetytromycyny, natomiast dimetylowanie wspomnianego nukleotydu prowadzi do oporności.

### **2.3. Mechanizmy oporności na makrolidy**

W latach 50-tych, krótko po wprowadzeniu erytromycyny zaobserwowano występowanie mechanizmów oporności u bakterii [48]. Stwierdzono, że koncentracja erytromycyny, przy której następuje oporność to 10-100 ng/l i jest obserwowana już po 40 minutach od poddania komórek działaniu antybiotyku [49].

Powszechne występowanie oporności na antybiotyki u bakterii osiągnęło stały poziom ok. 40% we wczesnych latach 60-tych [50]. Fenotyp ten jest popularny zarówno wśród Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych bakterii [51].

Zaskakujący jednak był fakt, iż mechanizm oporności bakterii na erytromycynę powodował nie tylko brak działania innych antybiotyków z grupy makrolidów, ale także niespokrewnionych z nimi chemicznie leków: linkozamidów oraz streptograminy B [52]. Zjawisko to zostało zaobserwowane najpierw u szczepu *S. aureus* [53] i nazwane zostało fenotypem oporności MLS<sub>B</sub>. Antybiotyki z tej grupy są efektywne głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim oraz beztlenucom [52]. Powyższa grupa antybiotyków jest

bardzo liczna i zawiera:

- makrolidy m.in.: karbomycynę, klarytomycynę, erytromycynę, spiramycynę oraz tylozynę;
- linkozamidy m.in.: klindamycynę, linkomycynę;
- streptograminy m.in.: wirginiamicynę M, streptograminę B.

Wiadomo również, że antybiotyki ze wszystkich trzech rodzin wspomnianej grupy MLS<sub>B</sub> wiążą się do tego samego miejsca w podjednostce 50S rybosomu [22].

Istnieją trzy mechanizmy oporności bakteryjnej na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>: aktywne usuwanie antybiotyku z komórki, enzymatyczna inaktywacja antybiotyku oraz modyfikacja miejsca wiązania antybiotyku. Niniejsza praca skupia się na ostatnim z wymienionych mechanizmów, ponieważ jest to najczęściej stosowany mechanizm oporności na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>.

W szczepach opornych nawet niewielka ekspozycja na działanie antybiotyków z grupy MLS<sub>B</sub> powoduje produkcję enzymu – metylotransferazy Erm – omawianego szerzej w dalszej części niniejszej pracy. Erm przeprowadza modyfikację miejsca wiązania antybiotyków z grupy MLS<sub>B</sub> – powoduje metylację w pozycji N1 adenozyne A2058 (numeracja *E. coli*), doprowadzając do oporności na wyżej wymienione antybiotyki. Stwierdzono, że już pojedyncza metylacja wyżej wspomnianej A2058 u *E. coli* powoduje oporność [31, 54]. W Gram-dodatnich bakteriach adenozyne 2058 jest modyfikowana do mono- lub dimetylowanej adenozyne (m<sup>6</sup>A lub m<sup>6,6</sup>A). Tymczasem w przypadku bakterii Gram-ujemnych spotykana jest tylko postać m<sup>6</sup>A.

Antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>, oddziałują z modyfikowaną przez ErmC' adenozyne 2058 [13, 38, 55]. Znaczenie w wiązaniu niektórych antybiotyków mają również białka L4 oraz L22 [56-58]. Stwierdzono, że niektóre substytucje aminokwasowe w L4 i L22 mogą potęgować oporność [57]. Natomiast delecja reszt aminokwasowych 82-84 (MKR) w białku L22 wpływa na jego położenie względem białka L4 oraz tunelu wiązania się antybiotyku, poszerzając wejście do tunelu [22]. Powyższe poszerzenie tunelu sprawia, że odległość niektórych antybiotyków od białka L22 jest zbyt duża, aby powstało między nimi wiązanie, które stabilizowałoby antybiotyk w położeniu w środku tunelu [58]. Nie zmienia to jednak faktu, że w przypadku połączenia zmetylowanego rRNA z białkami z organizmów wrażliwych na antybiotyki, oporność nadal występowała [30], co podkreśla kluczowość metylacji A2058.

Wspomniana adenozyzna w pozycji 2058 okazuje się być konserwowana u wszystkich bakterii typu dzikiego [38]. Stwierdzono także konserwację parowania typu Watson-Crick u pary 2057-2611, niemniej już same nukleotydy tworzące tę parę nie są aż tak istotne jak sama obecność wyżej wspomnianego parowania [55].

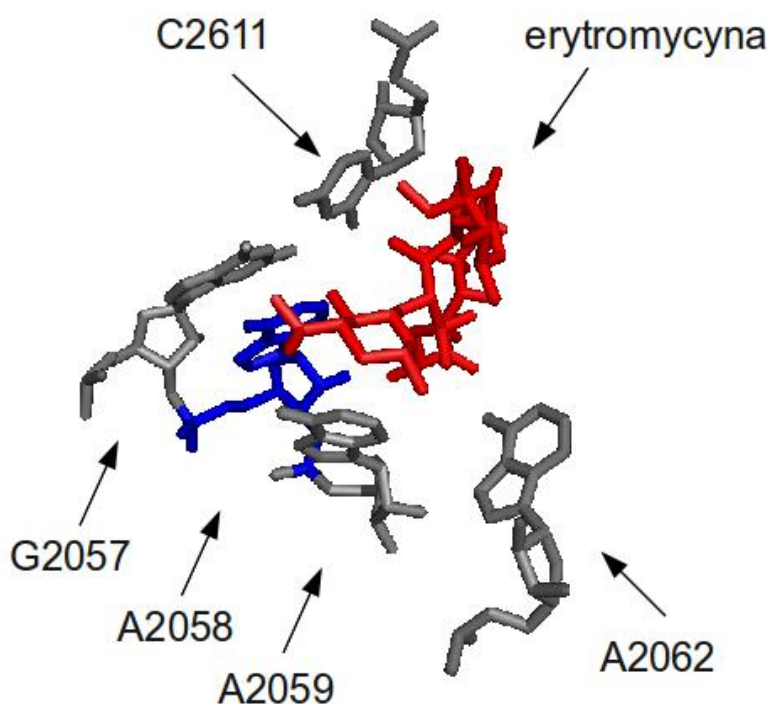
Mimo mocnej konserwacji są spotykane mutacje A2058 wspomagające wiele szczepów bakterii w walce z antybiotykami. Wykazano jednak, że mutanty te powodują mniejszą stabilność rybosomu, przez co w przypadku braku antybiotyków w roztworze, utrzymywanie tego typu zmiany jest dla bakterii bardzo niekorzystne.

Gatunki bakterii Gram-dodatnich z grupy *Actinomycetes* produkują większość ze znanych antybiotyków, wiążących się z rybosomem bakteryjnym [59] Aby chronić się przed wytwarzanymi przez siebie antybiotykami, ich producenci posiadają gamę mechanizmów obronnych, z których wiele zostało zaadaptowane przed bakterie patogenne.

Makrolidowy antybiotyk – tylozyna był szeroko stosowany w weterynarii, jako dodatek do żywności mający na celu zwiększenie wzrostu bydła oraz jako lek przeciwko dyzenterii i chorobom układu oddechowego u wielu zwierząt hodowlanych [60]. Producentem tylozyny jest bakteria Gram-dodatnia *Streptomyces fradiae*, która chroni się przed działaniem tego antybiotyku przez ekspresję determinantów oporności tlrA, tlrB, tlrC i tlrD [61]. Gen tlrB odpowiada za produkcję metylotransferazy RlmA(II) (dawniej nazywanej TlrB), modyfikującej G748 w 23S rRNA [62]. Tylozyna działa przeciwko bakteriom Gram-dodatnim. Co ciekawe, w innych niż *Streptomyces* bakteriach Gram-dodatnich oraz w przypadku bakterii Gram-ujemnych oporność nie jest obserwowana mimo metylacji G748. Sugeruje to istnienie dodatkowego czynnika niezbędnego do zaistnienia oporności. Okazało się, że modyfikacja G748 w synergii z metylacją A2058 prowadzi do oporności na tylozynę [63]. Ten synergistyczny mechanizm jest zauważalny dla makrolidów, posiadających cukry w zakresie od 5- do 14- pozycji pierścienia makrolaktonowego (tylozyny oraz mykanamycyny). Natomiast u innych antybiotyków z tej grupy, np. karbomycyny, spiramycyny czy erytromycyny, posiadających inne położenia cukrów synergia modyfikacji nukleotydów nie zachodzi.

Nukleotydy z pętli transferazy peptydylowej 23S rRNA (G2057, A2058, A2059, A2062, C2611) biorą udział w wiązaniu leków MLS<sub>B</sub> (Ryc.4). W obecności antybiotyków chronione są przed modyfikacją różne nukleotydy w zależności od użytego leku, uniemożliwiając bakterii wprowadzenie modyfikacji powodującej oporność, jeśli antybiotyk

już się związał. W przypadku erytromycyny chronione są A2058 i A2059, a karbomycyny – A2058, A2059 i A2062 [64]. Z kolei linkomycyna chroni A2058, natomiast klindamycyna, oprócz ww. adenozy, również A2059 [65]. Różnice te pokazują wyraźnie, że między antybiotykami z grupy MLS<sub>B</sub> istnieje istotne podobieństwo w ich miejscu wiązania do rybosomu, niemniej nie są to miejsca identyczne [66].



Ryc. 4 Nukleotydy w rybosomie *E. coli* będące w interakcjach z antybiotykami MLSB i erytromycyna [39].

## 2.4. Metylotransferazy

Metylotransferazy są enzymami przenoszącymi grupę metylową (-CH<sub>3</sub>) z donora tej grupy zwanego też kofaktorem, do akceptora – w omawianych w niniejszej pracy przypadkach jest to rRNA bakteryjne. Najczęściej spotykanym donorem grupy metylowej jest S-adenozyl-L-metionina (zwana inaczej AdoMet). Po odłączeniu grupy metylowej od AdoMet przekształcany jest on w S-adenozyl-homocysteinę w (AdoHcy) [67].

Mimo wspólnego kofaktora, mechanizm transferu grupy metylowej u metylotransferaz nie jest konserwowany. Nie widać również wyraźnej konserwacji sekwencji pomiędzy poszczególnymi rodzinami metylotransferaz. Konserwowany jest tylko rejon wiązania AdoMet [24].

### 2.4.1. Metylotransferaza ErmC'

Geny kodujące metylotransferazę ErmC' noszą nazwę erm (*ang. erythromycin ribosome methylation*). W latach 90-tych stwierdzono występowanie około trzydziestu genów erm pochodzących z różnych źródeł, zarówno wśród patogenów jak i naturalnych producentów antybiotyków. Geny kodujące ten enzym oraz jego homologi są obecne u większości szczepów *S. aureus* przejawiających oporność na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub> [30]. Świadczy to o tym, jak istotnym czynnikiem dla życia komórki jest obecność tych enzymów.

Metylotransferazy z rodziny Erm przeprowadzają posttranskrypcyjną metylację adenozyiny A2058 (numeracja *E. coli*) w pozycji N6 przez co antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub> tracą zdolność wiązania się do niej [30, 45]. Kofaktorem przeprowadzanej reakcji metylacji jest AdoMet. Nukleotyd A2058 jest obecny we wszystkich sekwencjach bakteryjnych. Znajduje się on w pętli transferazy peptydylowej utworzonej przez 5 helis połączonych mocno konserwowanymi rejonami jednoniciowymi.

Przeprowadzona analiza ewolucyjna [52] sugeruje, że metylotransferazy rRNA u bakterii Gram-dodatnich *cocci*, *Bacillus licheniformis* oraz u *Actinomyces* występują od bardzo dawna, a transfer genu erm następuje horyzontalnie między różnymi bakteriami.

Eksperymenty ze znakowaną adenozyną 2058 wykazują, że modyfikacja na tym nukleotydzie dokonywana jest przez enzym przed złożeniem rybosomu [51].

Badania za pomocą DMS (*ang. Dimethyl Sulfate*) wykazały, że ErmC' chroni niektóre nukleotydy w domenie V 23S rRNA. Są to rejony 2033-2049, 2085-2089 oraz kilka helis. Częściowo chroniona jest też pętla spinki w zakresie 2060-2067 zawierająca trzy następujące po sobie adenozyiny [52].

Przeprowadzono również badania ujawniające, iż enzym ErmC' występuje w roztworze w postaci monomerycznej [68].

#### 2.4.1.1. Mechanizm reakcji przeprowadzanej przez ErmC'

Dimetylacja N6, N6 przeprowadzana przez metylotransferazy z rodziny Erm jest złożona z dwóch następujących po sobie reakcji [69]. W pierwszej z nich grupa metylowa transportowana jest na atom N6 zasady A2058 tworząc monometylowany produkt pośredni. Wcześniej przypuszczano, że może istnieć sytuacja, w której po etapie monometylacji enzym

jest uwalniany i wiąże się po raz drugi z niższą specyficznością. W rzeczywistości okazało się, że niezmetylowany substrat wiąże się z taką samą specyficznością jak monometylowany. Kinetyki obu wiązań są bardzo zbliżone. Rozważania te sugerują, że metylacja N6 A2058 nie wpływa na strukturę drugo- i trzeciorzędową substratu, a powinowactwo enzymu do RNA po pierwszym etapie reakcji nie zmienia się. Omawiane procesy zobrazowane są poniżej:

1.  $23S\text{ rRNA} + \text{AdoMet} \rightarrow (\text{m}^6\text{Ade})\text{-}23S\text{ rRNA} + \text{AdoHcy}$
2.  $(\text{m}^6\text{Ade})\text{-}23S\text{ rRNA} + \text{AdoMet} \rightarrow (\text{m}^{6,6}\text{Ade})\text{-}23S\text{ rRNA} + \text{AdoHcy}$

#### **2.4.1.2. Wymagania odnośnie substratu dla *ErmC'***

Zdefiniowana została struktura motywu RNA rozpoznawanego przez metylotransferazy Erm [70]. Miejsce wiązania się metylotransferazy *ErmC'* znajduje się w domenie V 23S rRNA [71, 72].

Początkowo w poszukiwaniu minimalnego substratu [30] skupiono się na całej domenie V 23S rRNA liczącej 625 nukleotydów. Stwierdzono, że w przypadku mniejszych fragmentów rRNA mogących być substratami dla enzymów Erm, metylacja zachodzi w nieco mniejszym stopniu, niż w stosunku do całej domeny V [73]. Rezultat ten zasugerował, że musi istnieć wiele specyficznych oddziaływań w domenie V, które w przypadku znacznej części testowanych substratów zostały utracone. Przebadano 187 oligonukleotydów w celu identyfikacji substratu mającego reprezentować metylowane przez *ErmC'* 23S rRNA [74]. Zastosowano tu selekcję negatywną, sprawdzając jakie zmiany w rRNA spowodują brak oddziaływania z białkiem. Początkowym substratem był 72-nukleotydowy odcinek RNA, będący helisą 73 z 23S rRNA z dodanym fragmentem pętli zawierającym modyfikowaną zasadę. Mutacja A2060C zmniejsza 10-krotnie stopień metylacji. Podobny efekt wywołuje również podstawienie innych niż natywne nukleotydów w pozycji 2057, gdzie w formie dzikiej występuje guanozyna. Z kolei delecja jednonukleotydowej pętli C2055 powoduje zmniejszenie metylacji aż o 80% [74]. Widać zatem, że istnienie w tym miejscu wybrzuszenia jest bardzo istotne. Również mutacje tego nukleotydu wywołują negatywny efekt na metylację. Istnienie pary zasad 2054-2615 wydaje się być ważniejsze niż same konkretne nukleotydy na tych pozycjach sugerując, że rejon ten ważny jest dla podtrzymania struktury istotnej dla metylacji. Obecność dwóch guanozyn G2056 oraz G2057 w tych pozycjach jest bardzo istotna. Natomiast rodzaj nukleotydu

z którymi tworzą one parę jest mniej istotny i pełni tylko rolę stabilizacyjną. Okazuje się również, że u bakterii stopień konserwacji nukleotydów w pozycjach 2055, 2058 i 2061 sięga ponad 95%, podkreślając ich istotność dla tych organizmów. Podsumowując wnioski dotyczące poszczególnych zasad, widać, że wymagany dla wiązania Erm motyw zawiera sekwencję cgGAHAg [75] (numeracja 2055-2061 w *E. coli*), gdzie H oznacza dowolny nukleotyd oprócz guanozyny, pogrubione A to modyfikowana adenozyzna, natomiast słabsza preferencja dla pozostałych nukleotydów uwidoczniła się małymi literami.

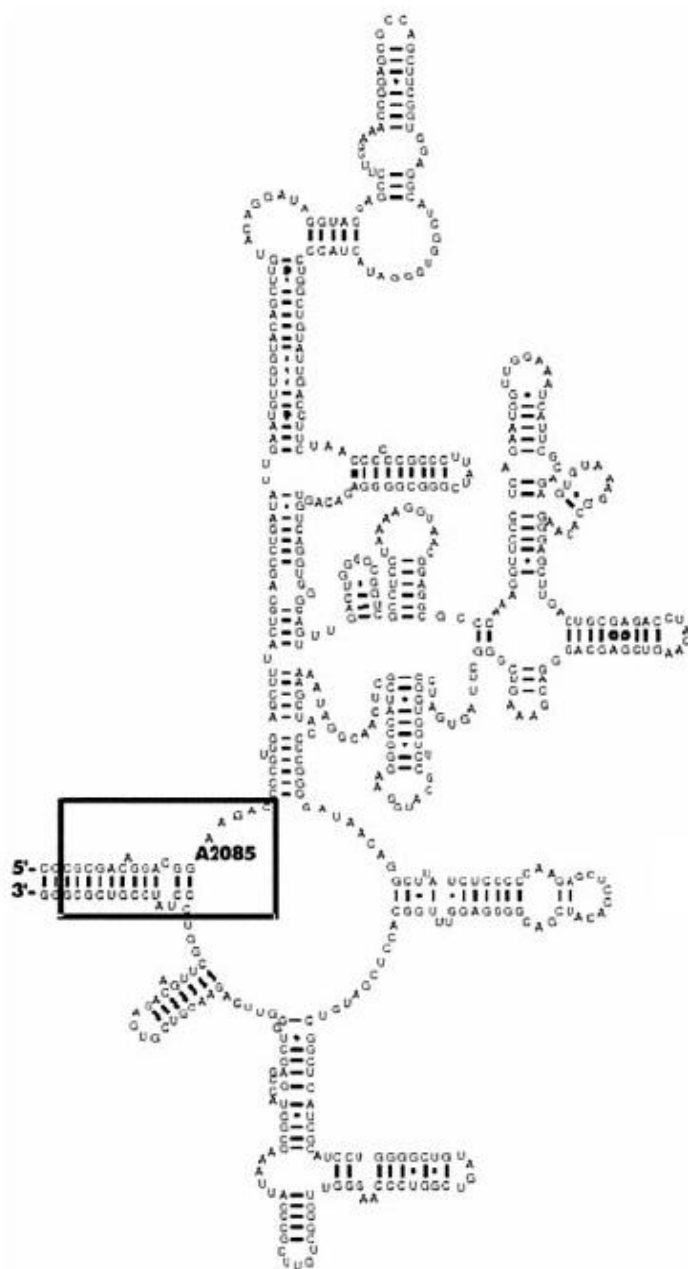
W części wynikowej pracy poświęconej ErmC' wykorzystano model minimalnego substratu RNA. Został on skonstruowany przez serię prób wydajności jego metylacji na różnych, stworzonych przez grupę badawczą Stevena Douthwaite [76], oligonukleotydach RNA. Substrat ten wykazujący metylację porównywalną do natywnego rRNA, został wykorzystany w badaniach podczas niniejszego doktoratu i ma strukturę drugorzędową przedstawioną na Ryc.5.



Ryc.5 Model minimalnego substratu RNA dla ErmC' – struktura drugorzędowa [76].

Minimalny substrat ErmC' ma kształt spinki do włosów, z dwoma wybrzuszeniami w części helikalnej – z jednej strony jednonukleotydowym (cytozyna), z drugiej dwunukleotydowym (adenozyzna i uracyl). Na końcu substratu znajduje się siedmionukleotydowa pętla zawierająca modyfikowaną adenozyne (ADE 2058).

Minimalny substrat pochodzi z dużej podjednostki rybosomu bakteryjnego, z fragmentu przedstawionego na Ryc.6 (zaznaczona adenozyzna posiada numerację A2058 w *E. coli* lub A2085 w *B. subtilis*).

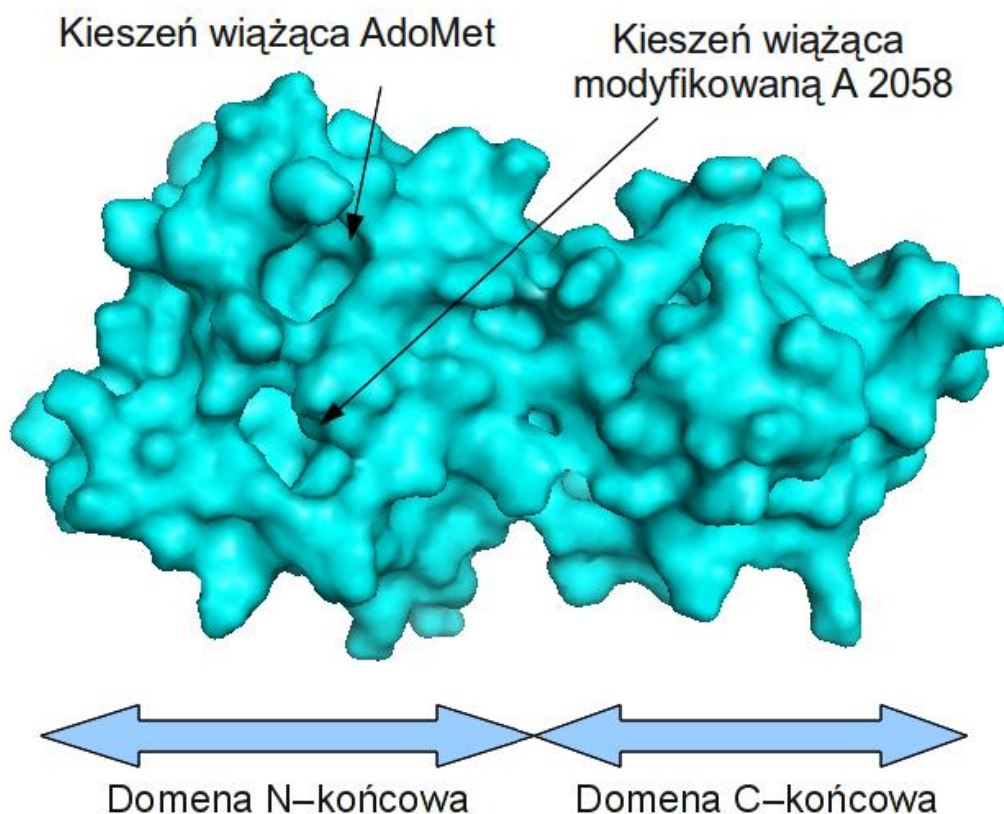


Ryc.6 Motyw V 23S rRNA w *B. subtilis* z zaznaczoną modyfikowaną adenozyzną [76].

### 2.4.1.3. Budowa *ErmC'*

W roku 1998 rozwiązano strukturę białka *ErmC'* z rozdzielczością do 3,0 Å [77], natomiast w 1999 z kofaktorem i jego analogami oraz rozdzielczością 2,2 Å [78]. Opisano strukturę domenową enzymu, gdzie widać, że domena N-końcowa – odpowiedzialna za wiązanie AdoMet – jest konserwowana u wielu enzymów bakteryjnych. Zaproponowano, że

domena C-końcowa ma rzadki zwój i prawdopodobnie odpowiada za wiązanie RNA [77] (Ryc. 7). Wnęka między domenami w białku ErmC' jest pozytywnie naładowana. Na tej podstawie można przypuszczać, że miejsce to może być odpowiedzialne za wiązanie substratu.

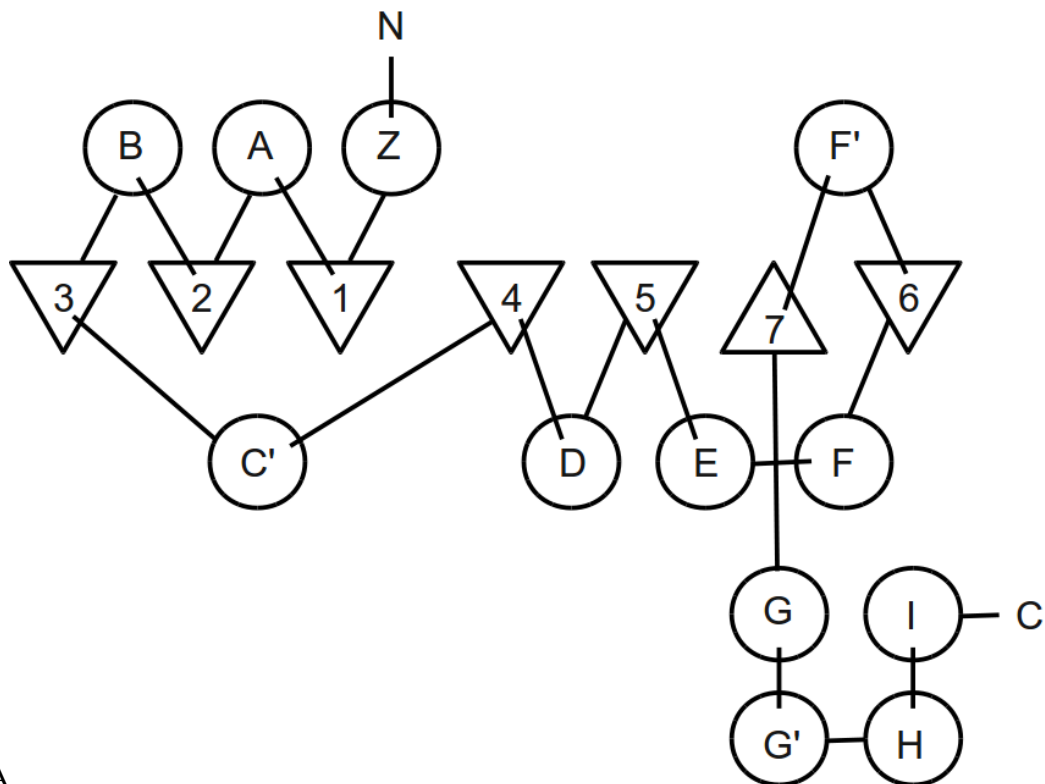


Ryc.7 Powierzchnia białka ErmC' z zaznaczeniem domen oraz kieszeni wiążących kofaktor (AdoMet) i modyfikowaną przez enzym adenozyne 2058.

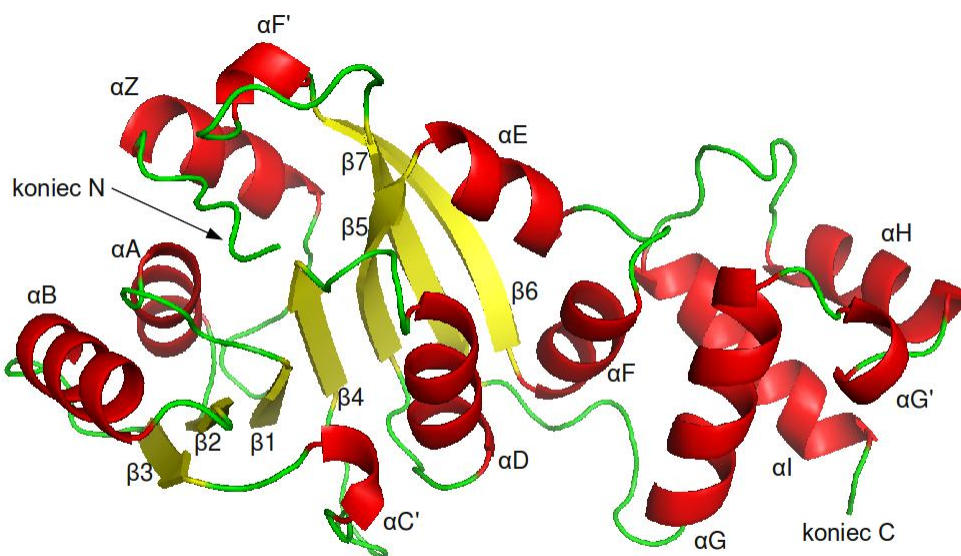
Struktura krystalograficzna ErmC' [78] zawiera reszty aminokwasowe Gln10-Lys244. Koniec N białka okazał się być na tyle labilny, że jego pozycja była trudna do ustalenia. Fragment ten był obiektem wielu późniejszych badań podjętych w niniejszej pracy, w celu dokładnego scharakteryzowania poziomu interakcji między enzymem a jego substratem.

ErmC' zawiera arkusz  $\beta$  złożony z 7 wstęg  $\beta$  (wstęgi  $\beta$ 1- $\beta$ 6 ułożone są równolegle, natomiast wstęga  $\beta$ 7 ułożona jest antyrównolegle między  $\beta$ 5 a  $\beta$ 6, stąd ułożenie w ramach arkusza  $\beta$  jest następujące:  $\beta$ 6- $\beta$ 7- $\beta$ 5- $\beta$ 4- $\beta$ 1- $\beta$ 2- $\beta$ 3). Arkusz  $\beta$  jest otoczony helisami  $\alpha$  (Ryc.8A). Ta konserwowana struktura tworzy wspomnianą wyżej domenę N-końcową. Z kolei za siódmą wstęgą  $\beta$  zaczyna się domena C-końcowa. Łącznikiem między wstęgami  $\beta$ 5 oraz  $\beta$ 7 są dwie helisy:  $\alpha$ E oraz  $\alpha$ F. Domena helikalna złożona jest z trzech helis  $\alpha$  tzn.

$\alpha$ G,  $\alpha$ H oraz  $\alpha$ I. Pierwsza z nich jest najdłuższa i położona prostopadłe do pozostałych dwóch (Ryc.8B). Międzydomenowe reszty aminokwasowe to: Arg178-Arg182. Maksymalną ruchomość w ErmC' wykazują: koniec N oraz pętla między wstęgami  $\beta$ 6 oraz  $\beta$ 7.



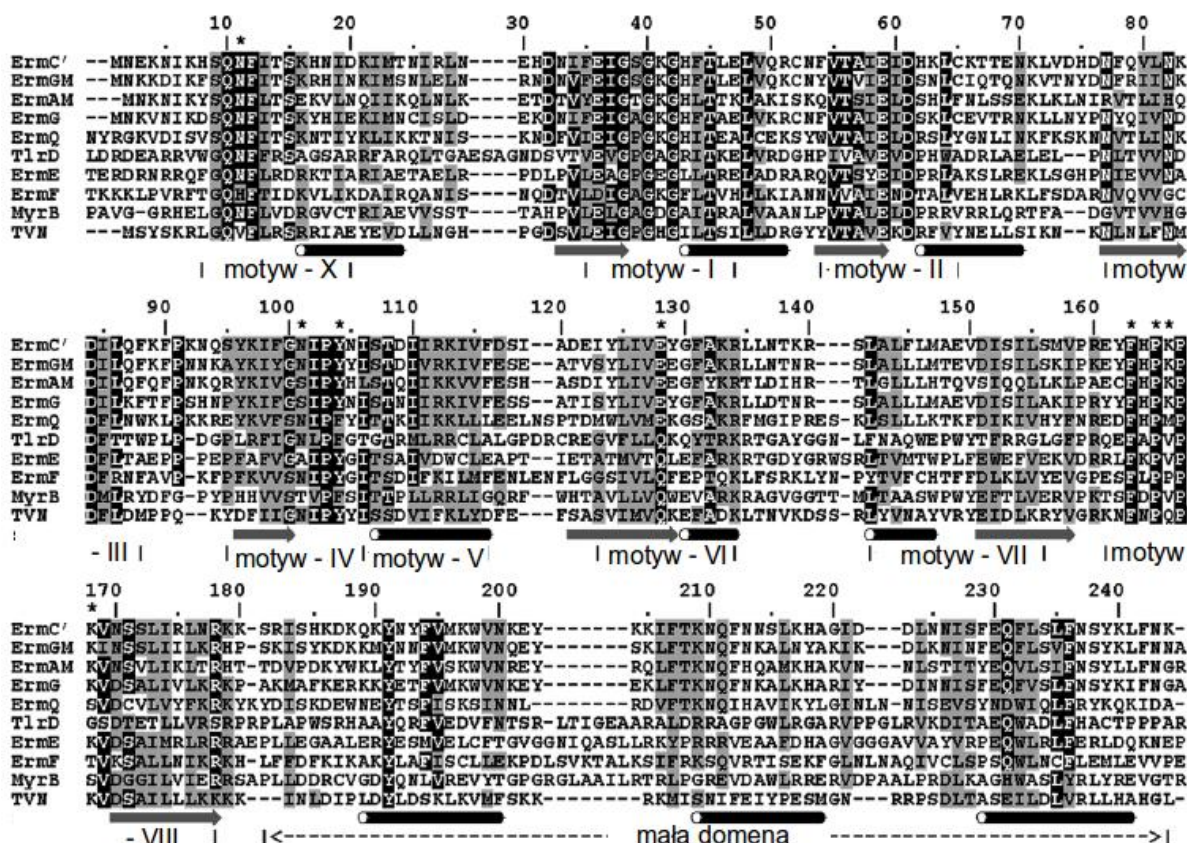
8A



8B

Ryc. 8 Reprezentacja struktur 2D w białku ErmC', widok płaski (A) oraz przestrzenny (B). W widoku przestrzennym helisy  $\alpha$  są oznaczone na czerwono, wstęgi  $\beta$  na żółto, a pętle na zielono. Kod PDB struktury krystalograficznej białka ErmC': 1QAO.

Na rycinie 9, znajduje się przyrównanie sekwencyjne członków rodziny Erm, obrazujące podobieństwa i różnice w strukturze pierwszorzędowej tych białek, a także omawiane niżej motywy strukturalne.



Ryc. 9 Przyrównanie ErmC' oraz innych członków rodziny Erm obrazujące struktury drugorzędowe oraz motywy strukturalne. Gwiazdką oznaczone są reszty poddane mutagenезie w celu określenia ich roli w wiązaniu RNA [80].

ErmC' zawiera motywy I-VIII oraz X, które stwierdzono pierwotnie u metylotransferaz DNA, a potem u metylotransferaz RNA. Motyw X poprzedza w strukturze motywy I-VIII. Na końcu C wstęgi  $\beta 1$  występuje motyw I. Łączy on  $\beta 1$  z  $\alpha B$  i tworzy część kieszeni wiążącej grupę metylową AdoMet.

Wśród powyższych metylotransferaz widać, że motyw II zawiera ujemnie naładowane reszty aminokwasowe w C-końcowej części wstęgi  $\beta 2$ . Zawierająca ten motyw pętla tworzy wiązanie wodorowe z grupami hydroksylowymi rybozy w AdoMet. Na końcu niniejszego motywu występuje hydrofobowa reszta aminokwasowa (w ErmC' – Ile60) oddziałująca przez siły van der Waalsa z pierścieniem purynowym AdoMetu.

W motywie III, stworzonym przez reszty aminokwasowe 77-88, Asp84 wiąże się wodorowo z grupą aminową adeniny w AdoMet. W ErmC' sekwencja GNIPY o pozycjach 100-104 tworzy trzon motywu IV poprzedzanego przez słabiej konserwowaną wśród metylotransferaz sekwencję YKIF [77].

W występującym dalej motywie V reszty aminokwasowe tworzą w ErmC' helisę  $\alpha$ D, a jego sekwencja poprzedzana przez Asn105 jest następująca: ISTDIIIRKIV [77].

Centrum motywu VI rozpoczynającego się w ErmC' od reszty aminokwasowej 123, zawiera reszty LIV w pozycji 125-127. Zasugerowano, że ww. reszty z motywu VI są zaangażowane w interakcję z pierścieniem purynowym modyfikowanej adenozyiny [81].

Motyw VII jest słabo konserwowanym rejonem tworzącym pętlę łączącą  $\alpha$ E z  $\beta$ 6 w granicach około 145-155 reszty.

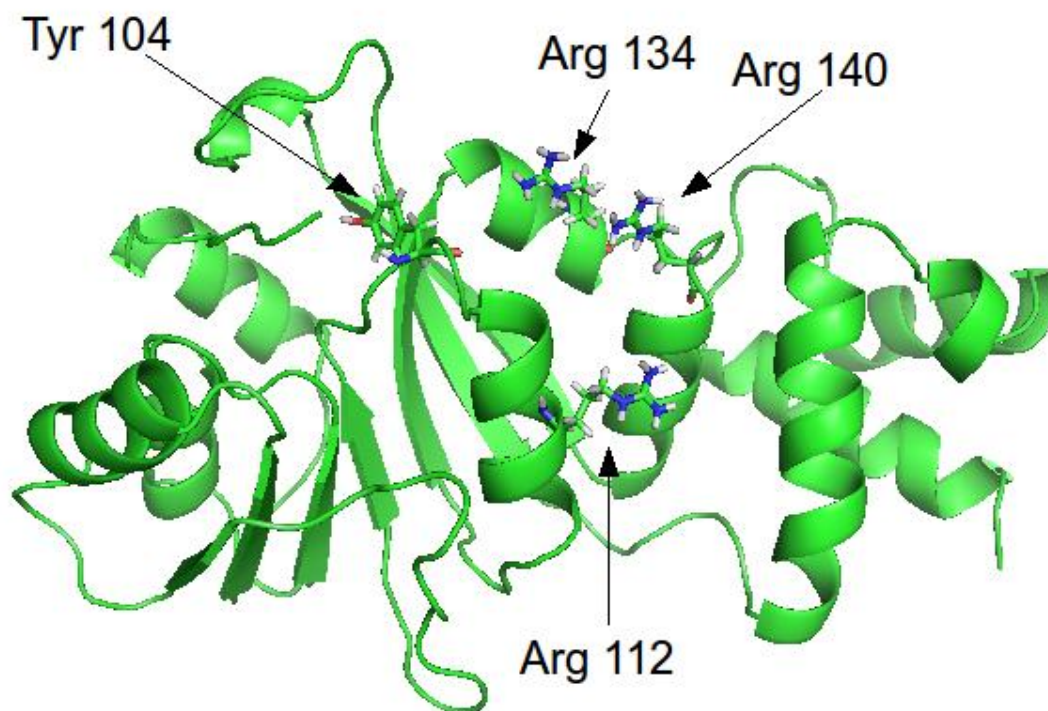
Z kolei pętla między  $\beta$ 6 a  $\beta$ 7, składająca się z reszt aminokwasowych Pro159-Val169, tworzy w ErmC' motyw VIII. Jest to łukowata struktura przy centrum aktywnym enzymu i zawiera mocno konserwowaną sekwencję rozpoczynającą się od Phe163, a składającą się z reszt FXPPXVXS (gdzie X oznacza dowolną resztę aminokwasową). Przeprowadzone zostało przeszukiwanie bazy SWISSPROT [79] powyższą sekwencją, ujawniając, że u ponad 90% z 50 najlepiej ocenionych w ww. przeszukiwaniu metylotransferaz zawierających ten mocno konserwowany rejon, odpowiada on za wiązanie adeniny [77]. Postuluje się zatem, że fragment ten odpowiada za wiązanie modyfikowanego nukleotydu w ErmC'.

Za wiązanie AdoMet odpowiadają hydrofobowe reszty aminokwasowe: Ile37 z motywu I, Ile60 z motywu II, Ile85 i Leu86 z motywu III oraz Ile110 z motywu V tworząc ściany wgłębienia na kofaktor. Również łańcuch boczny Glu59 oddziałuje z grupami hydroksylowymi rybozy, a Asp84 z azotem z części adenyłowej kofaktora.

Jeżeli natomiast chodzi o miejsce wiązania RNA, to znaczenie mają reszty aminokwasowe występujące na powierzchni białka bliskie kieszeni katalitycznej (Tyr104 oddziałującej z adenozyną) oraz zbliżone do domeny C-końcowej, tj. Lys133, Arg134, Lys139, Arg140 i Lys201 [77].

Kilka lat później przeprowadzono analizę trzynastu reszt aminokwasowych na powierzchni białka ErmC, przewidywanych jako odpowiedzialne za wiązanie RNA [76]. Przeprowadzone testy *in vitro* oraz *in vivo* sugerowały, że kluczowe reszty aminokwasowe pełniące tę funkcję znajdują się w domenie N-końcowej białka ErmC.

Wymienione jako najważniejsze dla oddziaływań z RNA są Tyr 104, Arg 134 oraz Arg140, których modyfikacje zmniejszają aktywność metylotransferaz ErmC *in vitro* w stosunku do niemodyfikowanego białka o 95%. Z wymienionych reszt aminokwasowych modyfikacja w Arg 134 prowadziła do całkowitej utraty aktywności ErmC *in vivo*. Substytucje reszt aminokwasowych 112 oraz 140 mocno zmniejszają aktywność enzymu, co sugeruje, że reszty te są ważne, ale nie krytyczne dla aktywności ErmC. Natomiast białko z modyfikacją Y104A wykazuje całkowitą utratę aktywności, co potwierdziły przytaczane dalej badania reszt bliskich miejsca aktywnego. Istnieje natomiast spore prawdopodobieństwo, że są one zaangażowane w wiązanie RNA, z czego wynikać może ich wpływ na aktywność. Wymienione reszty przedstawione są na Ryc.10.



Ryc.10 Reszty aminokwasowe w ErmC kluczowe dla wiązania RNA.

Substytucje aminokwasowe (N192A, M196A, K197A, N200A, E202A, K204A, K205A oraz K209A) C-końcowej domeny białka ErmC' [76] pokazały, że reszty te nie wpływają na wiązanie enzym–substrat. Aktywność enzymu typu dzikiego, w porównaniu ze zmodyfikowanym była zbliżona. Okazało się, że nawet pięć substytucji wprowadzonych równocześnie w domenie C-końcowej nie wpływa na wiązanie się enzymu do RNA.

Wynioskowano zatem, że domena ta nie ma znaczenia w rozpoznawaniu substratu przez enzym i może raczej pełnić rolę stabilizującą podczas wiązania się białka z RNA.

Przeprowadzono również badania polegające na modyfikacjach reszt bliskich miejsca aktywnego, w tym Asn11, Asn101, Tyr104, Glu128, Phe163, Pro165, Lys166 i Lys168 na alaninę [80].

Co ciekawe, przy badaniach parametrów kinetycznych zmodyfikowanych białek okazało się, że oprócz białka zawierającego modyfikację Y104A przejawiają one niemal identyczną aktywność katalityczną jak enzym typu dzikiego. Aktywność białka zawierającego modyfikację N101A zmniejszyła się, ale zaledwie o 10%, ukazując że mimo istotności w oddziaływaniu z modyfikowaną adenozyną Asn101, ma niewielki wpływ na wiązanie się RNA. Reszty aminokwasowe Asn101 oraz Tyr104 leżą w motywie IV ErmC'. Przeprowadzone badania sugerują, że Asn101 wiąże się wiązaniem wodorowym z AdoMet. Z kolei tylko białko z modyfikacją Y104A wykazuje całkowitą utratę aktywności. Widać zatem, że najistotniejszą resztą aminokwasową dla wiązania RNA jest Tyr104. Ważna jest także Pro165 co widać dzięki temu, że aktywność katalityczna białka zawierającego modyfikację P165A uległa mocnemu zmniejszeniu. Podkreślić warto również, że reszta ta jest konserwowana u wszystkich metylotransferaz.

Przeprowadzono badania reszt aminokwasowych w nieustrukturalizowanym w strukturze krystalograficznej końcu N białka ErmC' [82]. Ser9 jest pierwszą resztą aminokwasową w strukturze krystalograficznej, co pozwala sklasyfikować pierwsze osiem reszt jako labilne. Badania wykazały, że koniec N jest słabo konserwowany w rodzinie Erm. Jednakże znajdowanie się w nim reszt aminokwasowych naładowanych dodatnio sugerowałoby możliwość stabilizacji konformacji podczas wiązania się RNA do białka. W trakcie modyfikacji K4A oraz K7A okazało się, że białka zmodyfikowane przejawiają aktywność obniżoną o 30% w stosunku do enzymu typu dzikiego. Obserwacja ta popiera tezę, że mimo iż reszty aminokwasowe na końcu N analizowanego białka nie są istotne przy mechanizmie reakcji, mogą mieć wpływ na optymalne umiejscowienie modyfikowanego RNA względem ErmC'.



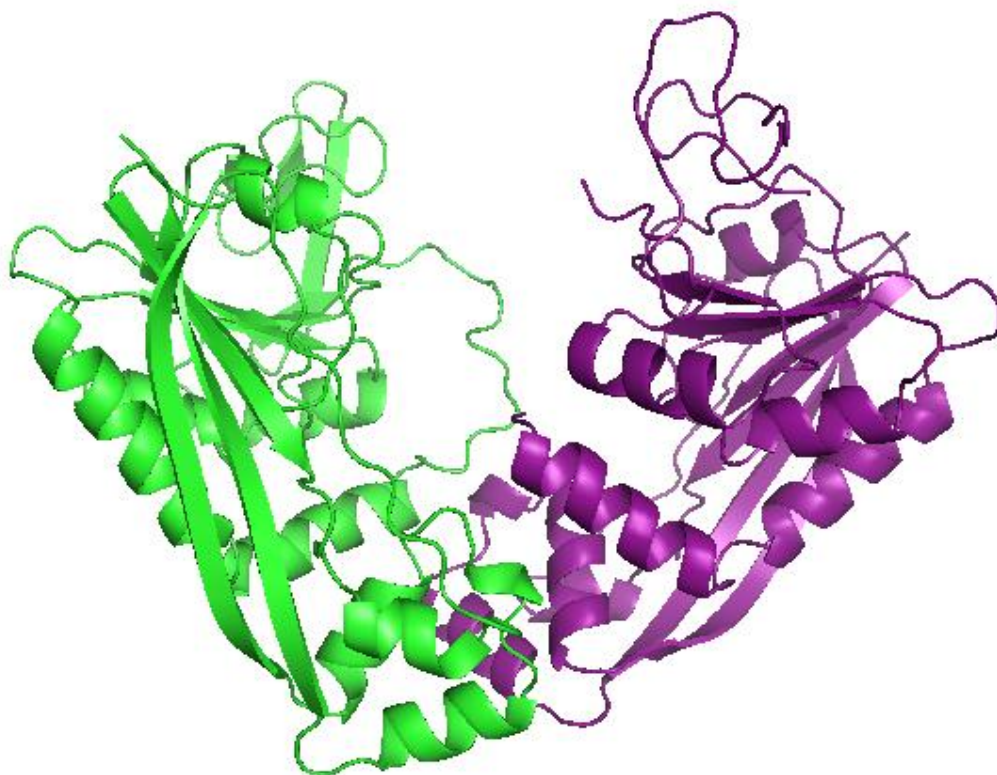
Niektóre Gram-dodatnie bakterie posiadają natomiast omawiany dalej enzym ortologiczny do wspomnianego, tj. RlmA(II) (dawniej nazywany TlrB). Enzym ten pochodzi z *S. fradiae* i przeprowadza metylację guanozyny G748 [62], co skutkuje opornością na tylozynę produkowaną przez ten organizm [53, 79, 80]. Antybiotyk ten wiążąc się do rybosomu bakteryjnego wypełnia sobą przestrzeń obecną między A2058 a G748. U *H. marismortui* w podjednostce 50S odległość między tymi nukleotydami wynosi 15Å [89]. Enzymy RlmA są obecne tylko u bakterii, jednak ich podobieństwo sekwencyjne do enzymów o podobnej funkcji obecnych u *Eukaryota* oraz *Archaea* sugeruje, że mamy tu do czynienia z większą, niescharakteryzowaną strukturalnie rodziną białek. Podobieństwo sekwencyjne między enzymami RlmA(I) i RlmA(II) wynosi ok. 29%.

N-końcowa domena RlmA(I) wiążąca atom Zn (reszty aminokwasowe 1-35) oraz C-końcowa domena metylotransferazowa (reszty aminokwasowe 51-269), połączone są giętym linkerem długości 12-15 reszt aminokwasowych [90]. W wiązaniu cynku uczestniczą reszty aminokwasowe: Cys-5, Cys-8, Cys-21 oraz His-25. Domena ta posiada niespotykany dotąd zwój Cys3His Zn, różniący się od dotychczas spotykanych motywów palca cynkowego (*ang. zinc finger domain*).

Przyrównanie sekwencji obu metylotransferaz RlmA ujawniło dwie grupy konserwowanych reszt aminokwasowych: CGEGYY i MTPF/yA/gW [90]. Konserwowane reszty aminokwasowe CGEGYY znajdują się w rejonie N-końcowym i odpowiadają za wiązanie donora grupy metylowej, którym jest S-adenozyl-L-metionina [91]. Natomiast druga grupa konserwowanych reszt aminokwasowych MTPF/yA/gW o nieznanym dotąd funkcji leży w rejonie C-końcowym.

Udowodniono, że RlmA(I) metyluje swój substrat, zanim RNA zostaje złożone z białkami rybosomalnymi w funkcjonalną podjednostkę 50S [86]. Struktura rybosomu, w tym rejonu rozpoznawanego i metylowanego przez RlmA(I) została rozwiązana techniką NMR ukazując, że G745 oddziałuje z A752 tworząc niekanoniczną parę zasad G-A [92]. W przypadku obecności cytozyny w pozycji 752, proces metylacji za pomocą RlmA(I) ulega znacznemu osłabieniu. Prawdopodobnie powodem osłabienia metylacji jest zaangażowanie docelowo metylowanego atomu N1 w wiązaniu powstającej pary zasad typu Watson-Crick (G-C) w miejscu niekanonicznej pary zasad G-A [92].

Rozwiązano strukturę krystalograficzną RlmA(I) z rozdzielczością 2,8 Å [93], co dało wiele użytecznych informacji o tym enzymie. Białko to występuje w postaci dimerycznej, zobrazowanej na rycinie 12. Kształt tego dimeru tworzy szczelinę w kształcie litery „W”, która jest miejscem wiązania spinki 35 rRNA (Ryc.12).



Ryc.12 Struktura dimeryczna białka RlmA(I) (kod PDB–1P91).

Struktura drugorzędowa monomeru RlmA(I) zawiera jednaście wstęg  $\beta$ , osiem helis  $\alpha$  oraz jedną helisę  $3_{10}$  (w odróżnieniu od helisy  $\alpha$  w której wiązania wodorowe tworzą się pomiędzy resztami aminokwasowymi o numerach  $i$  oraz  $i+4$ , w helisie  $3_{10}$  tworzone są one między  $i$  oraz  $i+3$ ). Pierwsze trzy wstęgi  $\beta$  tworzą mały, antyrównoległy arkusz  $\beta$ , będący częścią domeny wiążącej cynk. Pozostałe osiem wstęg  $\beta$  tworzy zwój charakterystyczny dla metylotransferaz.

Trzon szczeliny „W” tworzą dwie domeny metylotransferazowe monomerów. Obie doliny szczeliny „W” – po jednej dla każdego z monomerów, zawierają związane cząsteczki kofaktora – S-adenozyl-L-metioniny. Helisy  $\alpha$ : 6, 7, 8, helisa  $3_{10}$  tworzą miejsce styku monomerów składających się na strukturę dimeryczną. Również wstęga  $\beta_{10}$  z jednego monomeru oddziałuje ze swoim odpowiednikiem w drugim monomerze.

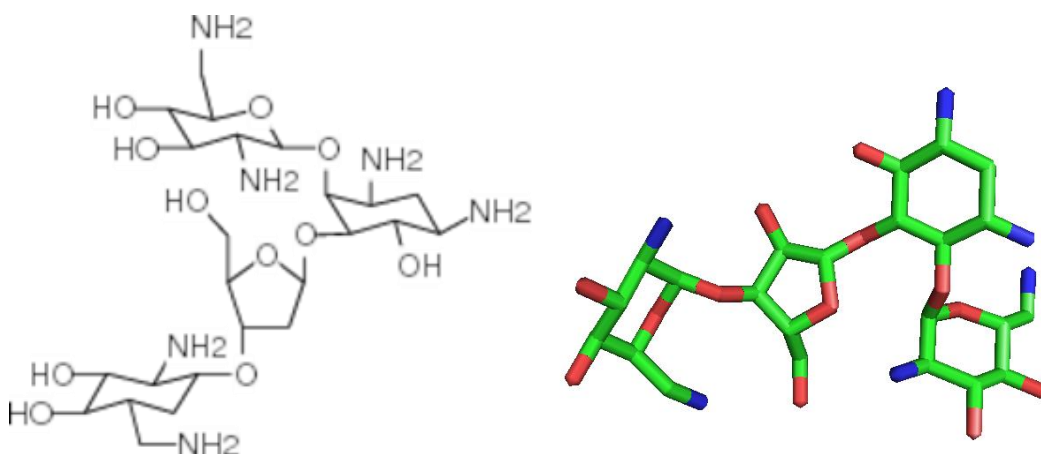
Znane są reszty aminokwasowe uczestniczące w wiązaniu AdoMet. Są nimi: Arg58, Leu62, Tyr67, Leu70, Gly93, Tyr99, Ile155, Tyr156, His183, Leu184, Met233 oraz Pro235 [90]. Co ciekawe, są one identyczne lub podobne w obu enzymach – zarówno RlmA(I) jak i RlmA(II).

Jeśli chodzi o całą domenę metylotransferazową RlmA(I) ma ona charakterystyczny zwój przypominający analogiczną domenę w analizowanym białku ErmC'. Mimo występujących homologii strukturalnych miejsca wiązania kofaktora, podobieństwo sekwencyjne odpowiadających sobie przestrzennie regionów wynosi jedynie 9%.

Dane doświadczalne [89] ujawniły, że atomy N1 czterech adenzyn o numeracji od 749 do 752 są silnie eksponowane w stronę rozpuszczalnika. Stwierdzono także, iż RlmA(II) chroni przed modyfikacją A749, A751 oraz A752 w spince 35 oraz A734 i A761 w trójkierunkowym rozwidleniu (*ang. three way junction*) między helisami 33-34-35 [89].

## **2.5. Aminoglikozydy i metylotransferazy z rodziny Kam**

Aminoglikozydy to antybiotyki takie jak gentamycyna czy neomycyna, które wiążą się do 16S rRNA bakteryjnej podjednostki 30S, blokując wzrost łańcuchów białkowych [94, 95]. Antybiotyki te składają się ze związków polikationowych z centralnym pierścieniem aminocyklicznym, połączonym wiązaniami glikozydowymi z resztą cukrową (Ryc.13).



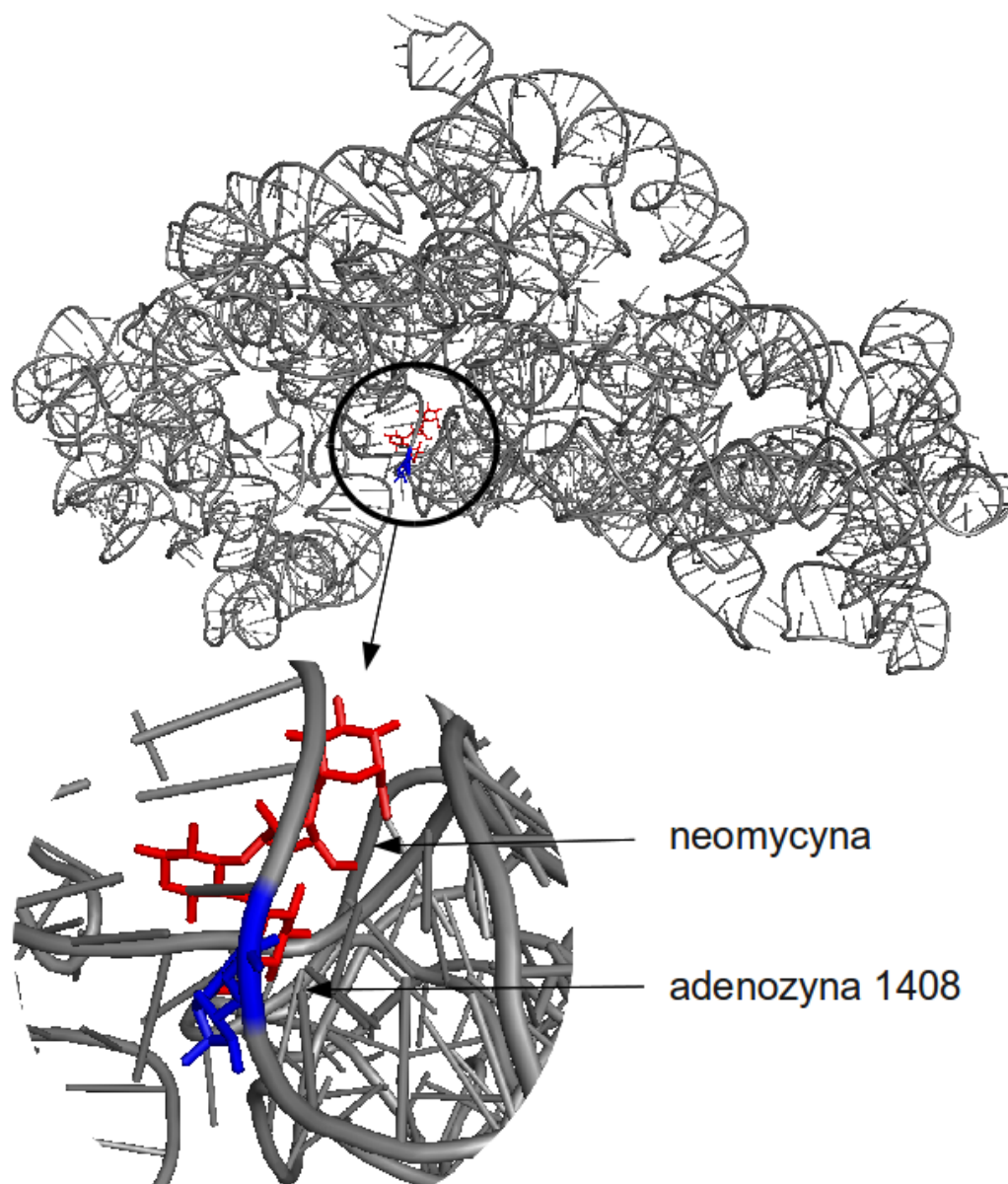
Ryc.13 Neomycyna jako przykładowy aminoglikozyd.

Aminoglikozydy są w ostatnich latach obiektem licznych badań, co zaowocowało rozwiązaniem struktur krystalograficznych dla tych antybiotyków związanych do rybosomów bakteryjnych [96 – 98]. Liczne grupy hydroksylowe oraz aminowe nadają cząsteczkom aminoglikozydów ładunek dodatni. Istnieją trzy klasy tych antybiotyków [99]. Do pierwszej należą: kanamycyna, gentamycyna, tobramycyna, amikacyna tj. 2-deoksystreptaminy podstawione w pozycjach 4 oraz 6 (4,6-DOS). Druga klasa to 4,5-DOS czyli leki analogiczne, ale podstawione w pozycjach 4 oraz 5, do których należą neomycyna i paromomycyna. Ostatnia z tych klas zawiera pozostałe aminoglikozydy czyli apramycynę, streptomycynę, hygromycynę B oraz spektynomycynę. Aminoglikozydy były używane w weterynarii przeciwko wielu groźnym infekcjom wywołanym przez zarówno Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne bakterie chorobotwórcze. Są one użyteczne do leczenia takich infekcji jak posocznica, czy infekcje górnych dróg oddechowych.

Aminoglikozydy były pierwotnie produkowane przez szczepy *Streptomyces* i *Micromonospora* [100, 101]. Wraz z początkiem lat 50-tych, gdy zaczęto stosować te antybiotyki, odnotowano powstawanie oporności wśród patogenów [102].

W 2003 roku została zaobserwowana oporność na aminoglikozydy spowodowana przez działalność metylotransferazy operującej na 16S rRNA [103, 104]. Rozpoznano wówczas pięć genów kodujących metylotransferazy Arm, homologiczne do enzymów Kam modyfikujących ten fragment rybosomu: *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* [105, 106].

Metylotransferazy powodujące wspomnianą oporność dzielą się na dwie grupy. Pierwsza grupa metyluje atom N7 nukleotydu G1405 w 16S rRNA powodując oporność na kanamycynę oraz gentamycynę [107]. Metylotransferazy z drugiej grupy metylują atom N1 nukleotydu A1408 w 16S rRNA (ryc. 14), przez co powstaje oporność na kanamycynę, tobramycynę, sisomycynę oraz apramycynę [101, 108, 109]. Metylację m<sup>7</sup>G1405 przeprowadzają enzymy z rodziny Arm (*ang. Aminoglycosyde Resistance Mtase*) [110], a modyfikację m<sup>1</sup>A1408 – białka z rodziny Kam (*ang. Kanamycin Apramycin Methyltransferase*) [111]. Kolejne badania pozwoliły zidentyfikować nowy plazmid, w którym przenoszona była informacja o metylotransferazie NpmA, metylującej A1408 [112].



Ryc. 14 Neomycyna w pobliżu adenozyzny 1408 w 16S rRNA rybosomu *E. coli*.

Analizowane w niniejszej pracy białko KamB rozpoznaje następującą sekwencję: 1406-UCACACCAUG-1415 [113]. Jak wspomniano wcześniej, aminoglikozydy wiążą się do 16S rRNA. Wówczas podstawniki obecne przy ich pierścieniu aromatycznym znajdują się w pobliżu nukleotydu A1408, stąd zmiana tego nukleotydu ma tak istotne znaczenie w mechanizmie oporności. Zjawisko to obserwowane jest w przypadku apramycyny i kanamycyny, nie dotyczy natomiast paronomycyny [114]. Przypuszcza się, że dodatkowe interakcje, w które wchodzi ten ostatni antybiotyk kompensują częściowo utratę

oddziaływania z A1408. Paronomycyna okazała się skuteczna mimo metylacji A1408. Ww. antybiotyk nie tylko utrudnia proces translacji, ale również zaburza proces składania się podjednostki 30S [115, 116]. Z kolei gentamycyna [117] oraz tobramycyna [118] wiążąc się z RNA uzyskują kontakt z G1405 przez podstawniki pierścienia aromatycznego. Metylacja powyższego nukleotydu powoduje utrudnienia w wiązaniu się antybiotyków m.in. przez oddziaływania elektrostatyczne. W tym przypadku paronomycyna oraz neomycyna okazują się nadal skuteczne, gdyż wiążą się pod innym kątem do RNA, przez co metylacja G1405 nie utrudnia im wiązania substratu.

Minimalne stężenie powodujące inhibicję (*ang. MIC – minimum inhibitory concentration*) aminoglikozydów, zostało zmierzone w szczepie *E. coli* zawierającym plazmid kodujący KamB. Okazało się, że dla 4,6-DOS poziom MIC dla aminoglikozydów wyniósł 1000 µg/ml. W przypadku higromycyny B zaobserwowano nawet MIC wynoszące 150 µg/ml. Z kolei obecność KamB nie spowodowała oporności na gentamycynę.

Przez długi czas członkowie rodzin Arm oraz Kam występowali tylko w organizmach będących producentami antybiotyków. Niestety przez horyzontalny transfer genów alarmująco wzrosła ilość patogenów takich jak *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* oraz *Proteus*, u których występują te enzymy [119].

Zaobserwowano przenoszenie się genów oporności np. kodujących białka z rodziny Arm z bakterii Gram-dodatnich do Gram-ujemnych [120]. Jest to niewątpliwie jeden z czynników sprawiających, że problem oporności jest tak poważny.

## 3. Metody

### 3.1. Dynamika molekularna

Dynamika molekularna (*ang. Molecular Dynamics*) jest metodą pozwalającą na symulowanie zachowania się systemów biologicznych (zarówno mikro- jak i makromolekularnych) w warunkach natywnych przy pomocy sprzętu komputerowego i odpowiedniego oprogramowania.

Metoda ta znajduje kilka głównych zastosowań np. przy badaniu struktury i oddziaływań w białkach, kwasach nukleinowych oraz ich kompleksach przez próbkowanie przestrzeni konformacyjnej [121]. Symulacje pozwalają śledzić ruch indywidualnej cząsteczki w funkcji czasu. Mogą zatem dostarczyć wielu cennych informacji o wewnętrznych właściwościach symulowanego systemu. Omawiana dalej analiza wektorów własnych umożliwia uzyskanie opisu systemu w stanie równowagi (np. amplitudy ruchu cząsteczek). Analiza trajektorii pozwala zbadać tendencje zmian układu w czasie np. przez zmiany RMSD (*ang. Root Mean Square Deviation*) – czyli średniego odchylenia kwadratowego – mówiącego w przypadku dynamiki molekularnej o tym, na ile model w danej chwili czasu (np. na końcu symulacji) odbiega od początkowego:

$$\text{model początkowy} = \{x_{1,1}, x_{2,1}, \dots, x_{n,1}\}$$

$$\text{model końcowy} = \{x_{1,2}, x_{2,2}, \dots, x_{n,2}\}$$

$$RMSD(\text{modelkońcowy}, \text{modelpoczątkowy}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{1,i} - x_{2,i})^2}{n}}$$

gdzie:

$x_{i,j}$  – współrzędna  $i$ -tego atomu modelu  $j$

$n$  – liczba atomów badanej cząsteczki

Oddziaływania pomiędzy atomami układu opisuje się za pomocą pola siłowego (*ang. force field*), czyli funkcji energii potencjalnej i zestawu parametrów. W odróżnieniu od mechaniki kwantowej w której bierze się pod uwagę nawet elektrony, w dynamice

molekularnej najczęściej układ uproszczony jest do poziomu atomowego. Funkcja energii potencjalnej zawiera wiele składowych m.in. energie wiązań, kąty torsyjne, oddziaływania elektrostatyczne czy van der Waalsa. Parametry pola siłowego wyznacza się eksperymentalnie lub teoretycznie na podstawie obliczeń kwantowo-mechanicznych [122].

Uproszczone równanie funkcji energii potencjalnej przedstawione jest poniżej:

$$E = \sum s1 \cdot E_{\text{wiązań}} + \sum s2 \cdot E_{\text{kątów}} + \sum s3 \cdot E_{\text{torsyjnych}} + \sum s4 \cdot E_{\text{niezwiązanych}}$$

gdzie:

$E_{\text{wiązań}}$  – to energia wiązań między atomami. Odpowiada na pytanie, w jaki sposób zmieni się energia danego wiązania w zależności od jego długości;

$E_{\text{kątów}}$  – mówi o zmianach kątów wiązania między trójkami atomów;

$E_{\text{torsyjnych}}$  – informuje jak zmieni się energia w zależności od obrotu wiązania;

$E_{\text{niezwiązanych}}$  – mówi o pozostałych oddziaływaniach w układzie pomiędzy atomami nie połączonymi bezpośrednimi wiązaniami tj. o oddziaływaniach elektrostatycznych i van der Waalsa.

$s1, s2, s3, s4$  – parametry poszczególnych elementów pola siłowego

Istnieje kilka najczęściej używanych pól siłowych, a najbardziej popularnymi są CHARMM [122] oraz AMBER [123]. Pełnoatomowe pola siłowe zapewniają parametry (np. kąty, ładunki, długości wiązań) do opisu każdego atomu w analizowanym układzie. Istnieją również na potrzeby złożonych symulacji tzw. gruboziarniste pola siłowe, w których cała reszta aminokwasowa jest traktowana jako atom (zredukowana reprezentacja cząsteczki). Pozwala to na zmniejszenie liczby symulowanych atomów, a przez to skrócenie czasu obliczeń.

Symulacje dynamiki molekularnej prowadzi się zwykle w mikrokanonicznym zespole statystycznym (NVE), w którym liczba cząstek, objętość i całkowita energia są stałe. Inne możliwe zespoły to NVT, w którym utrzymywana jest stała temperatura i objętość lub NPT, w którym utrzymywana jest stała temperatura i ciśnienie.

Parametrem, przy pomocy którego można regulować przebieg procesu dynamiki molekularnej jest temperatura układu. Im jest ona wyższa, z tym większą prędkością poruszają się wszystkie symulowane atomy. Prędkości początkowe przypisywane są losowo na podstawie rozkładu Maxwella-Boltzmanna dla danej temperatury – równania

określającego, jaka część ogólnej liczby cząsteczek gazu doskonałego porusza się w danej temperaturze z określoną prędkością przy założeniu równowagi termicznej tego gazu. Przy tej samej początkowej temperaturze można uzyskać odmienne rezultaty zmieniając przypisanie prędkości początkowych dla poszczególnych atomów za pomocą generatora liczb pseudolosowych.

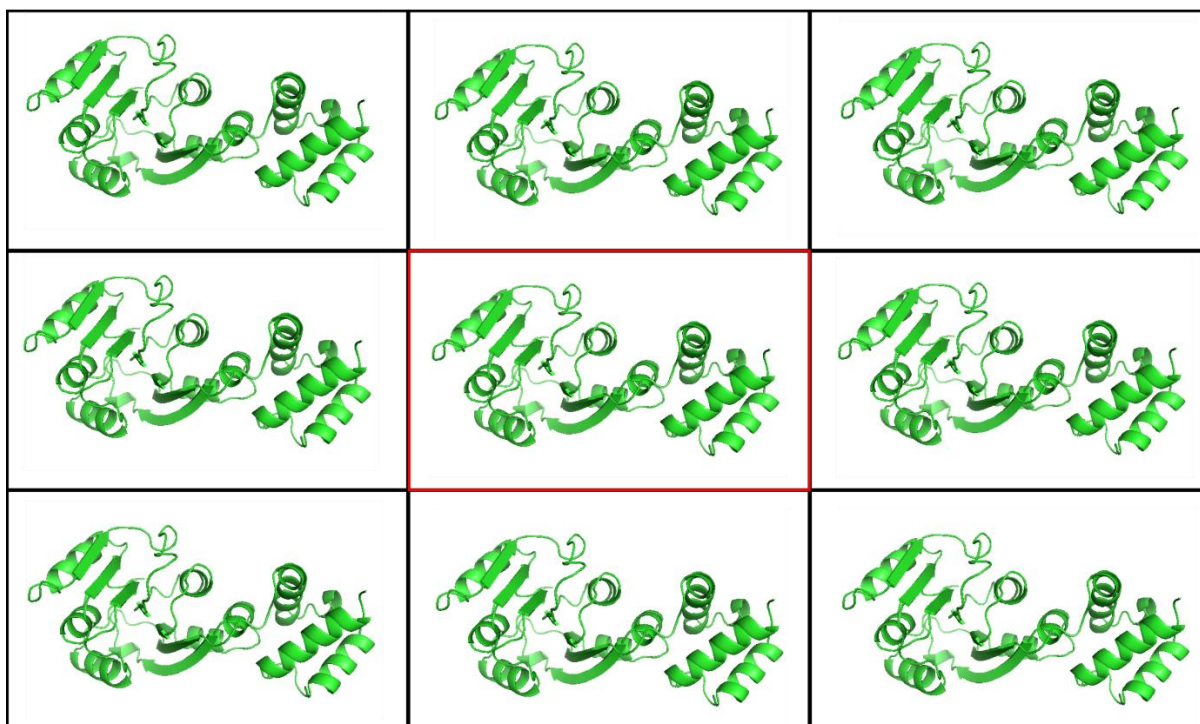
Do numerycznego rozwiązywania równania ruchu Newtona (obliczania położeń i prędkości układu oddziałujących cząsteczek w funkcji czasu) stosowane jest kilka algorytmów. Jednym z najpopularniejszych jest algorytm Verleta [124], który wykorzystuje pozycje atomów i ich przyspieszenia w chwili czasu  $t$  i  $t-1$ , aby uzyskać nowe położenie atomu w chwili czasu  $t+1$ . Jest to jeden z najbardziej znanych algorytmów rozwiązywania newtonowskich równań ruchu głównie ze względu na prostotę oraz łatwość implementacji. Wadą tak uproszczonego algorytmu jest jego niska dokładność, gdyż nie wykorzystuje on bezpośrednio prędkości do obliczeń położenia atomu w chwili  $t+1$ .

Rozwinięciem metody Verleta jest algorytm „leap-frog” [125] biorący pod uwagę prędkości atomów w chwili  $t-1$  oraz przyspieszenia i położenia atomu w chwili  $t$ . Zaletą podejścia „leap-frog” w stosunku do algorytmu Verleta jest bezpośrednie wykorzystanie prędkości, jednak jako że używana jest prędkość z innej chwili czasu niż aktualne położenie atomu w chwili  $t$ , obarczony jest on również błędem obliczeniowym.

Warto podkreślić, iż w trakcie symulacji układu zmieniają się położenia wszystkich atomów. Jak można się domyślić, w pewnych warunkach gdy chcemy badać tylko fragment układu, zjawisko to może okazać się wysoce nieekonomiczne. W przypadku badania dynamiki dla fragmentu układu możliwe jest nałożenie więzów na pewną część układu, a w podanej sytuacji – „zamrożenie” struktury fragmentu domeny. Zastosowanie takiego posunięcia niesie za sobą kolejną wymierną korzyść – zmniejsza, często w znaczącym stopniu, rozmiar symulowanego układu, a tym samym skraca czas symulacji. Nadmienić można, że w przypadku usztywnionego fragmentu układu nie jest on usuwany z symulowanego systemu, ale jest traktowany jak bryła nieruchoma, dzięki czemu nie istnieje konieczność wyliczania prędkości oraz ich modyfikacji dla takiego fragmentu.

Rozróżnia się dwa sposoby traktowania rozpuszczalnika w metodzie dynamiki molekularnej:

1. Dynamika molekularna z pełnoatomową reprezentacją roztworu (ang. Explicit Solvent Molecular Dynamics) – współcześnie najczęściej stosowana odmiana dynamiki molekularnej, polegająca na dodaniu do układu cząsteczek rozpuszczalnika (wody). Objętość układu jest dobierana indywidualnie i zależy od rozmiaru badanej cząsteczki. Najczęściej tworzy się układy prostopadłościenne oraz oktaedryczne. W metodzie tej stosuje się omawiane poniżej tzw. okresowe warunki brzegowe (ang. *periodic boundary conditions*). Symulowana molekula jest wówczas zanurzona w cząsteczkach rozpuszczalnika tworząc układ, który ma z każdej strony swoje wierne kopie. Dzięki temu, np. w przypadku przesuwania się cząsteczki wody w ramach układu i jej wyjścia poza jego krawędź, cząsteczka ta „wejdzie” do tego układu z przeciwnej strony, a ilość cząsteczek w symulowanym układzie jest stała. Dobieranie rozmiaru układu jest ważnym procesem w procedurze wykonywania dynamiki molekularnej. Zbyt duży rozmiar powoduje, że symulowana liczba atomów właściwej biomolekuły będzie stanowić znikomy procent wszystkich atomów układu. W takim przypadku zużywana będzie niepotrzebnie nadmiarowa moc obliczeniowa na symulowanie ruchów samych cząsteczek wody. Konieczne jest zachowanie bezpiecznego marginesu odległości skrajnych atomów badanej molekuly od brzegów systemu (np. 5-12Å) oraz zdefiniowania tzw. punktu odcięcia (ang. *cut off*), który mówi na jaką odległość będą brane pod uwagę oddziaływania międzycząsteczkowe. Dzięki temu unika się ww. oddziaływania cząsteczki badanej z jej kopiami. Schemat obrazujący wzajemne ułożenie układu badanego białka oraz otaczających go kopii w metodzie explicit solvent jest przedstawiony na Ryc.15. Dla zwiększenia czytelności ryciny cząsteczki wody wypełniające poszczególne układy nie zostały przedstawione.

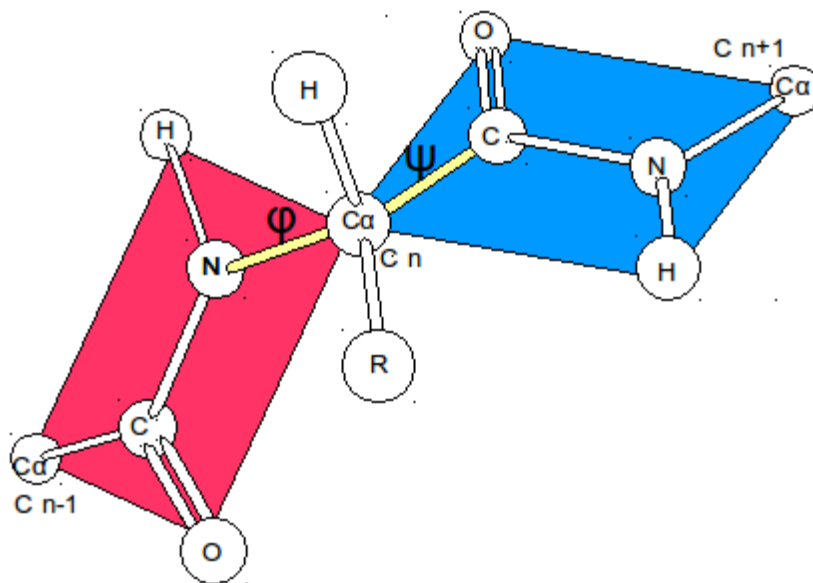


Ryc.15 Układ symulowanego białka (czerwony prostokąt) wraz z otaczającymi go kopiami.

2. Dynamika molekularna z rozpuszczalnikiem modelowanym jako ośrodek ciągły (ang. Implicit Solvent Molecular Dynamics) – dynamika molekularna, w której do układu nie są dodawane żadne cząsteczki rozpuszczalnika, a jego obecność jest jedynie symulowana poprzez odpowiednie równania fizyczne pola siłowego. Jest to metoda znacznie mniej złożona obliczeniowo od wariantu pierwszego, jednak uproszczenie związane z brakiem rzeczywistych cząsteczek rozpuszczalnika sprawia, że niektóre oddziaływania np. poprzez cząsteczki wody nie zostaną uwzględnione. Natomiast dużą zaletą tej metody jest możliwość prowadzenia dłuższych symulacji i lepszego przeszukiwania przestrzeni konfiguracyjnej układu.

Rotacja wokół wiązań w peptydzie jest dopuszczalna wg ściśle określonych reguł. Warto w tym miejscu zdefiniować kąty torsyjne (Ryc. 16), będące jednym z elementów określających strukturę trójwymiarową cząsteczek. Kąt torsyjny jest to kąt obrotu wokół wiązania 2-3 w łańcuchu utworzonym przez cztery połączone ze sobą atomy 1-2-3-4. Dla dwóch sąsiadujących grup CONH istnieją różne kombinacje kątów torsyjnych  $\phi$  i  $\psi$ , gdzie  $\phi$  (kąt fi – między węglem  $\alpha$  a azotem) oraz  $\psi$  (kąt psi – między węglem  $\alpha$  a węglem karbonylowym). Jest ich jednak skończona liczba, ze względu na to, iż grupy CONH tworzą

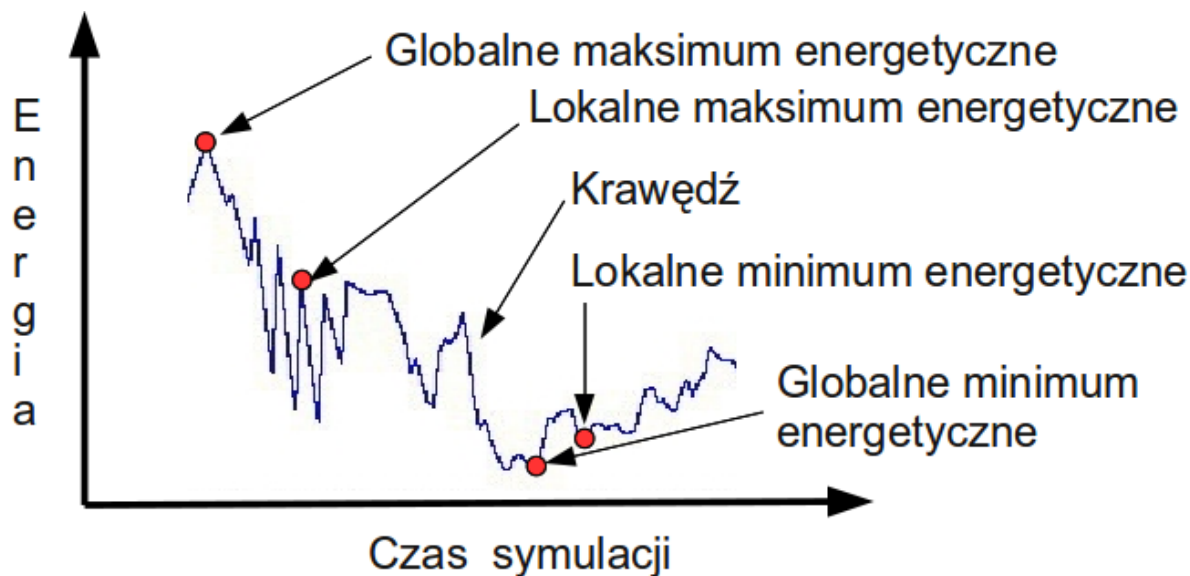
sztynne płaszczyzny, które przy pewnych kombinacjach tych kątów kolidowałyby ze sobą. Mimo tego ograniczenia, liczba możliwych kombinacji kątów torsyjnych grup CONH jest duża i rośnie lawinowo wraz ze wzrostem długości łańcucha białkowego. Dopuszczalnymi wartościami tych kątów zarządzają programy przeprowadzające proces dynamiki molekularnej.



Ryc.16 Graficzna reprezentacja kątów torsyjnych  $\phi$  oraz  $\psi$  (definiujących kształt szkieletu białka).

Dozwolone zestawienia kątów torsyjnych są opisywane wykresem Ramachandrana [17], który obrazuje dopuszczalne rotacje w łańcuchu peptydowym. Modyfikacje kątów torsyjnych prowadzą do zmiany energii cząsteczki, a także energii całego układu. Zmiany te można uwidocznic jako mapę energetyczną, w której dołki to minima energetyczne, wierzchołki – maksima, a krawędzie łączą minima z maksimami (Ryc. 17).

W dynamice molekularnej początkowa konformacja badanej biocząsteczki pochodzi zazwyczaj z danych krystalograficznych, NMR lub została wymodelowana. Znajduje się ona najprawdopodobniej na jednej z krawędzi łączących minimum z maksimum. Gdyby zastosować bardzo zachowawcze ustawienia metody (np. niska temperatura), dotarlibyśmy najprawdopodobniej jedynie w dół krawędzi do najbliższego położonego minimum energetycznego (minimum lokalne), które mogłoby okazać się nie znaczącą konformacją artefaktyczną.



Ryc. 17. Przykładowa mapa energetyczna symulacji dynamiki molekularnej. W osi pionowej przedstawiona jest energia potencjalna układu, a w poziomej – czas przeprowadzanej symulacji. Zobrazowane są także lokalne i globalne maksimum oraz minimum energetyczne.

Proces dynamiki molekularnej można przedstawić następująco:

1. Struktura początkowa.
2. Przygotowanie pliku specyficznego dla danego układu (np. PSF- Protein Structure File w CHARMM) zawierającego szczegółowy opis poszczególnych atomów cząsteczek współtworzących układ, nie zawiera natomiast parametrów pola siłowego.
3. Zobojętnienie układu, wytworzenie siły jonowej ( $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ ). W niektórych układach istnieje konieczność dodania jonów mogących w znacznej mierze wpływać na właściwości symulowanych cząsteczek. Czynność ta realizowana jest specjalnym skrypcem, a stosowana zwłaszcza w przypadku obecności w układzie kwasów nukleinowych, których ujemny ładunek ze względu na obecność fosforanów neutralizowany jest odpowiednią liczbą jonów dodatnich. Najczęściej stosuje się kationy jednowartościowe tj.  $\text{Na}^+$  lub  $\text{K}^+$ , ale w niektórych układach wykorzystuje się też dodatek jonów dwuwartościowych  $\text{Mg}^{2+}$ .
4. Otoczenie symulowanego układu cząsteczkami rozpuszczalnika – dzięki czemu uzyskujemy układ do symulacji opisywanej wcześniej dynamiki molekularnej typu explicit solvent.
5. Etap minimalizacji – przed samym procesem dynamiki molekularnej przeprowadzany jest proces minimalizacji energii układu. Sprzyja to redukcji lub zniwelowaniu

ewentualnych naprężeń istniejących w układzie. Minimalizacja energii jest procesem bardzo istotnym, gdyż jest znacznie mniej obciążająca czasowo od dynamiki molekularnej, a mimo to wprowadza pewne niewielkie zmiany konformacyjne w analizowanym układzie. Poddanie cząsteczek działaniu tak dużych sił, jak w dynamice molekularnej bez uprzedniej minimalizacji energii mogłoby skutkować niestabilnym zachowaniem się układu w toku badania. W drastycznych przypadkach mogłoby to spowodować rozpadem cząsteczek lub całego układu ze względu na niezrównoważone napięcia wewnętrzne.

6. Weryfikacja poprawności układu na podstawie minimalizacji. Etap ten jest rzadko wymienianym, a bardzo ważnym punktem całego procesu badawczego. W przypadku układów silnie labilnych istnieje możliwość, że sama minimalizacja spowoduje jego całkowitą destabilizację. Dzięki temu, już na etapie mało złożonej obliczeniowo minimalizacji, ujawniana jest niestabilność systemu. Umożliwia to powrót do poprzednich kroków procesu przygotowywania dynamiki molekularnej i jego stosowną optymalizację. W pewnych przypadkach pomaga samo zwiększenie długości procesu minimalizacji, co prowadzi do stabilizacji układu. Niemniej nie jest rzadkością na tyle silna destabilizacja układu, że niecelowe jest jego dalsze symulowanie. Zachodzi wówczas konieczność weryfikacji położenia początkowych składników układu (w przypadku kompleksów) bądź też optymalizacja struktury badanej biocząsteczki.
7. Przeprowadzenie procesu symulacji dynamiki molekularnej i weryfikacja wyników. Jest to kluczowy etap, w którym po wstępnym przypisaniu prędkości poszczególnym atomom układu, program symuluje ich wzajemne zachowania i oddziaływania.
8. Analiza uzyskanej trajektorii dynamiki molekularnej. Badane są ruchy wewnątrzcząsteczkowe, wzajemne ruchy cząsteczek w ramach kompleksu, badanie tendencji zmienności RMSD lub analiza głównych składowych (*ang. PCA – principle component analysis*), a w szczególności wyznaczenie ruchów poszczególnych aminokwasów wzdłuż wektorów własnych. Przez wektor własny rozumiany jest wektor wzdłuż którego istnieją oscylacje w ramach danej cząsteczki. Wyodrębnienie ruchów wzdłuż wektorów własnych pozwala na odróżnienie oscylacji od tła tzn. drgań poszczególnych atomów czy też drobnych ruchów innych reszt, nie mających wpływu na globalną strukturę cząsteczki lub jej lokalny fragment.

W pracy wykorzystano program CHARMM, używając pola siłowego CHARMM22 dla białek i CHARMM27 dla kwasów nukleinowych. Do obliczenia oddziaływań elektrostatycznych wykorzystane zostało sumowanie Ewalda [126]. Do zrównoważenia ujemnego ładunku RNA obecnego w symulowanych układach użyto jonów  $\text{Na}^+$ . Przy minimalizacji została wykorzystana metoda największego spadku (*ang. Steepest Descent*) [127]. Do dynamiki molekularnej używano algorytmu „leap-frog”. Symulacje przeprowadzono w temperaturze 300°K.

Wykorzystana została metoda symulacyjna explicit solvent – symulowany układ cząsteczek był otaczany cząsteczkami wody. Model kompleksu białko-RNA stworzony przez prof. Janusz Bujnickiego [76] został wykorzystany jako wejściowa struktura do badań.

Symulacje dynamiki molekularnej prowadzone były według następującego schematu:

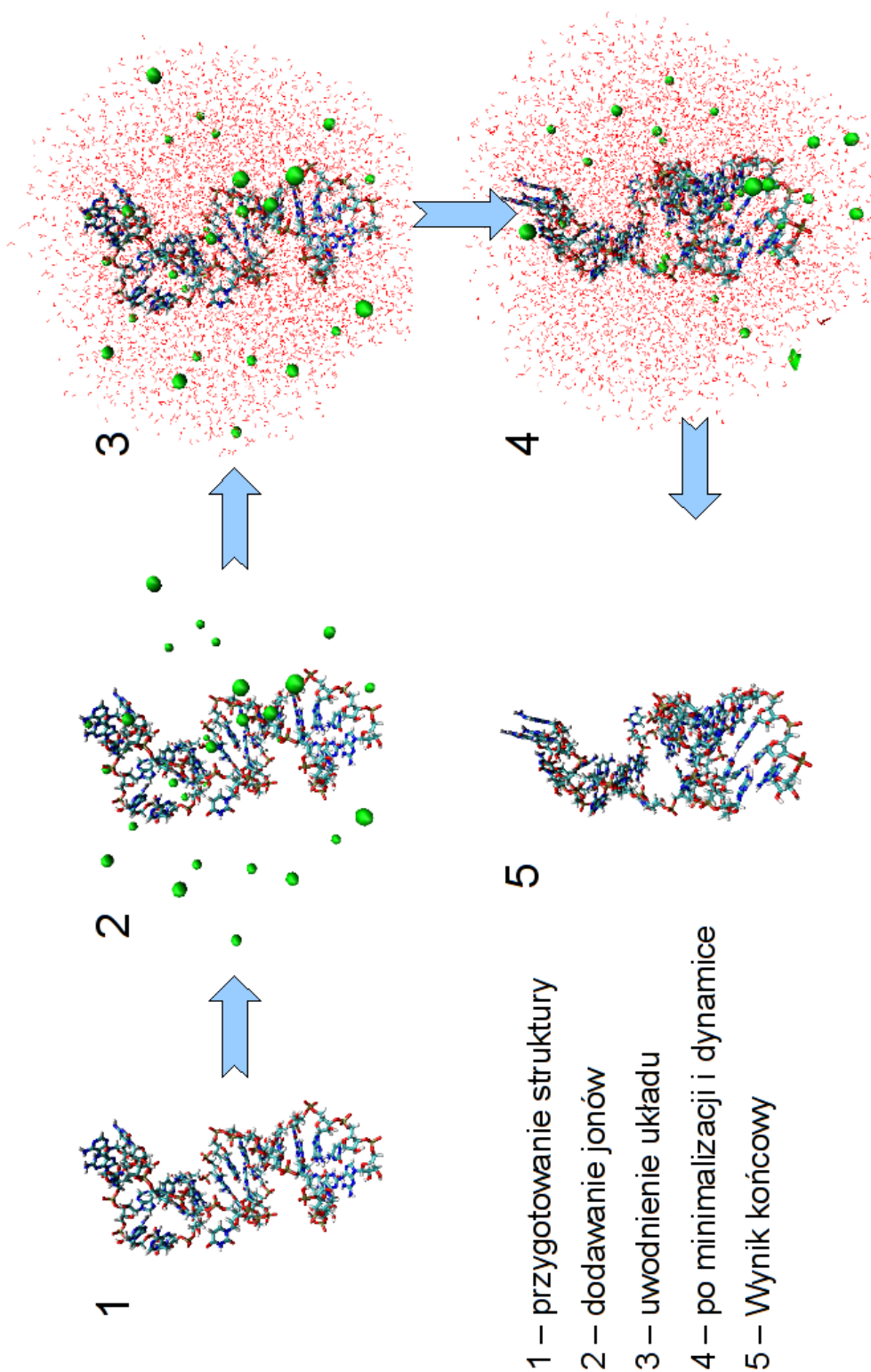
1. Symulacja minimalnego substratu RNA – symulowane RNA zostało otoczone cząsteczkami wody z progiem odcięcia 5Å. Układ RNA wraz z rozpuszczalnikiem uzyskał wymiar 35 x 40 x 70 Å. W ramach układu zdefiniowanych było 1160 atomów RNA. Dodanych zostało 8010 atomów wody oraz 31 jonów  $\text{Na}^+$  dla zubożenia układu. Następnie została wykonana minimalizacja rozpuszczalnika o długości 1000 kroków z krokiem czasowym 2fs. Przeprowadzono również dynamikę molekularną rozpuszczalnika i jonów o długości 2500 kroków po 2 fs. Symulacja została rozpoczęta w temperaturze 298°K. Przez 25.000 kroków (po 0,002 ps – w sumie 50ps) było prowadzone podnoszenie temperatury aż do 310°K. Symulacja prowadzona była w  $T=310^{\circ}\text{K}$  przez kolejne 2ns (1.000.000 kroków po 2 fs każdy). Ze względu na wspomnianą w wynikach niestabilność substratu została przeprowadzona również druga symulacja trwająca 3,2 ns (1.600.000 kroków po 0,002 ps).
2. Symulacja białka ErmC' – symulowane białko zostało otoczone cząsteczkami wody z progiem odcięcia 5Å. Cały układ białka razem z wodą uzyskał rozmiar 90 x 64 x 54 Å. W ramach układu zdefiniowane były 4122 atomy białka oraz 32955 atomów wody. Na początku symulacji została ustawiona temperatura 298°K. Następnie wykonano minimalizację rozpuszczalnika o długości 1000 kroków po 2 fs oraz dynamikę molekularną rozpuszczalnika (2500 kroków po 0,002ps co daje 5ps). Przez pierwsze 25.000 kroków (po 0,002 ps, co daje 50 ps) symulacji następowało

wygrzewanie (stopniowe podnoszenie temperatury) aż do wartości 310°K. Symulacja dynamiki molekularnej białka ErmC' trwała 8 ns (4.000.000 po 0,002 ps każdy). Badanie wektorów własnych białka ErmC' przeprowadzone zostało przy pomocy pakietu GROMACS [128]. Danymi wejściowymi do analizy była trajektoria symulacji dynamiki molekularnej uzyskanej dla białka ErmC' przy pomocy programu CHARMM. Analizowana trajektoria miała 8 ns długości. Z wykorzystaniem g\_covar z pakietu GROMACS została wygenerowana mapa korelacji (zwana też macierzą kowariancji) pokazująca korelacje ruchów w różnych fragmentach białka. Dzięki takiej mapie staje się możliwe zaobserwowanie czy pewne grupy reszt aminokwasowych poruszają się wspólnie w kierunku zgodnym (korelacja pozytywna), przeciwnym (korelacja negatywna), czy też nie są skorelowane. Wykorzystanie polecenia g\_anaeig pozwoliło wyznaczyć projekcje trajektorii na główne wektory własne wzdłuż których następowały oscylacje.

3. Symulacja kompleksu białko-RNA – symulowany układ został otoczony cząsteczkami wody z wykorzystaniem progu odcięcia o wartości 7Å. Cały układ uzyskał przez to rozmiar 90 x 74 x 74 Å. W ramach układu zdefiniowanych było 5144 atomy białka oraz RNA jako symulowanego kompleksu. Zostało dodane 31 jonów Na<sup>+</sup> oraz 47109 atomów wody. Następnie przeprowadzono krótką minimalizację w próżni metodą największego spadku (500 kroków) dla zrelaksowania napięć w strukturze początkowej. Sumaryczna długość minimalizacji w próżni wyniosła 1 ps. Została wykonana minimalizacja rozpuszczalnika o długości 1000 kroków po 0,002 ps każdy, co dało sumaryczny czas trwania tego etapu – 2 ps. Przeprowadzono również dynamikę molekularną samego rozpuszczalnika o długości 2500 kroków po 0,002 ps, co dało 5ps. Następnie nastąpiło wygrzewanie przez 25.000 kroków (50 ps) od temperatury 298°K do 310°K. Symulacja dynamiki molekularnej kompleksu białko-RNA przeprowadzana była w temperaturze 310°K, z krokiem 0,002 ps. Przeprowadzone zostało 2.500.000 kroków, co dało sumaryczny czas symulacji 5 ns.

Schemat metody dynamiki molekularnej znajduje się na Ryc.18.

# Schemat dynamiki molekularnej



Ryc. 18 Schemat dynamiki molekularnej. Wynikiem końcowym jest trajektoria ruchów symulowanych cząsteczek. Często końcowa konformacja może odpowiadać strukturze natywnej np. jeśli układ się ustabilizował.

### **3.2. Dokowanie mikromolekularne**

Dokowanie mikromolekularne jest metodą, pozwalającą na dopasowywanie małych cząsteczek do drugiego związku lub jego fragmentu np. do kieszeni katalitycznej.

Cząsteczka dopasowywana jest nazywana ligandem i w dokowaniu mikromolekularnym używanym do projektowania leków jest niewielką cząsteczką chemiczną. Zawiera ona co najwyżej kilkadziesiąt atomów, w tym dość często fragmenty pierścieniowe z różnymi podstawnikami.

Cząsteczka, którą badamy i do której dopasowywany jest ligand, określana jest mianem receptora. Może nim być np. białko, ale także kwas nukleinowy. Dokowanie do kwasów nukleinowych jest tematyką znacznie trudniejszą, ze względu na znacznie mniejszą stabilność cząsteczek w porównaniu do białek (szczególnie dynamiczne jest RNA) oraz niską specyficzność.

Dokowanie mikromolekularne to metoda pozwalająca na szukanie potencjalnych leków na wiele chorób poprzez dopasowywanie inhibitorów (ligandów) do różnych cząsteczek bakteryjnych pełniących funkcje ważne dla przeżycia tych mikroorganizmów. Oczywiście, jako że nie jest to technika doświadczalna, należy zachować ostrożność w analizowaniu jej wyników. Jest to jednak bardzo obiecująca metoda, gdyż pozwala ona wyłonić spośród mnogości możliwych do zastosowania cząsteczek takie, których badanie eksperymentalne ma sens. Dzięki omawianej metodzie udaje się odrzucić większość ligandów, które nie pasują do receptora, np są za duże dla badanej kieszeni katalitycznej.

Bardzo użytecznym zastosowaniem tej techniki jest również tworzenie modeli oddziaływań receptor-ligand w przypadkach, gdy znamy dokładnie cząsteczki ze sobą oddziałujące, natomiast sposób ich wiązania i charakter oddziaływania nie zostały do końca poznane. Bazując na funkcjach oceniających systemu dokowania molekularnego można stworzyć modele, które z dużą dozą prawdopodobieństwa odzwierciedlać mogą rzeczywiste oddziaływania cząsteczek w naturze. Celem funkcji oceniających jest określenie energii wiązania się liganda do receptora.

Głównymi problemami związanymi z dokowaniem mikromolekularnym są po pierwsze wygenerowanie struktur bliskich natywnej, a po drugie – wyszukanie tej struktury w licznych rezultatach dokowania.

Metoda dokowania mikromolekularnego omówiona na przykładzie działania programu DOCK [129] składa się z kilku kroków opisanych poniżej:

1. Przygotowanie receptora – cząsteczka biomolekuły, do której będzie przeprowadzane dopasowywanie liganda, musi zostać przygotowana do procesu dokowania. W tym celu najpierw jest ona uwodorniana, następnie liczone są ładunki elektrostatyczne na powierzchni i na koniec zapisuje się ją w pliku o formacie zrozumiałym dla programu dokującego.
2. Przygotowanie cząsteczki liganda – do cząsteczki dopasowywanej mikromolekuły muszą być dodane wodory, a następnie powinna ona być zapisana do stosownego formatu pliku.
3. Generowanie powierzchni molekularnej – zostaje wygenerowana powierzchnia molekularna cząsteczki receptora. Pozwala to na dokładne dopasowanie dokowanego liganda do kieszeni, której badaniem jesteśmy zainteresowani.
4. Na podstawie powierzchni molekularnej wygenerowanej w pkt. 3, udokładniane jest miejsce wiązania liganda. Każdy program przeprowadza ten etap używając różnych metod. Na przykład program SPHGEN [130] tworzy wokół całej cząsteczki receptora teoretyczne sfery. Każda z nich odpowiada miejscu w przestrzeni, w którym korzystne energetycznie byłoby umieścić atom dokowanego liganda. Następnie, w zależności od potrzeb danego procesu dokowania wybiera się zbiór sfer, które będą wykorzystywane w procesie dokowania. W zależności od konkretnego projektu selekcjonuje się:
  - największy klaster wygenerowany przez program do tworzenia sfer – w przypadku, gdy nie mamy żadnej informacji o przewidywanym miejscu wiązania liganda do cząsteczki receptora. Największy klaster znajduje się w najbardziej korzystnym z punktu widzenia energetycznego miejscu cząsteczki receptora, stąd może pomóc uzyskać wartościowe rezultaty;
  - sfery w zadanym rejonie cząsteczki receptora – w przypadku, gdy znane jest w przybliżeniu miejsce wiązania cząsteczki liganda. Metoda taka zapewnia, iż wszystkie uzyskane konformacje wynikowe liganda znajdą się w pobliżużądanego punktu powierzchni, który jest istotny z punktu widzenia prowadzonych badań.

Powyższe sfery są wykorzystywane przez program DOCK, który dokując ligandy umieszcza jak najwięcej ich atomów w centrach tych sfer. Z kolei wykorzystywany również w pracy program Surflex [131] tworzy prototyp liganda tzw. „protomol” będący dużą sztuczną cząsteczką pasującą do receptora. Jeśli ligand pasuje strukturalnie do „protomola” lub jego fragmentu – oceniany jest wysoko.

5. Generowanie układu – po wybraniu sfer ogranicza się analizowany fragment receptora do objętości wynoszącej tyle, co rozmiar sfer plus pewien zadany próg (zwykle ok. 5Å). Powstaje przez to prostopadłościenna bryła, w której wnętrzu mieszczą się rozwiązania dopuszczalne dokowania. Objętość układu dobierana jest tak, aby pokryła całą interesującą nas powierzchnię receptora. Położenia ligandów wykraczające poza ww. układ są odrzucane.
6. Generowanie siatki – jest to etap tworzący mapę energetyczną układu z pkt. 5, na podstawie położenia sfer i powierzchni receptora. Program DOCK wykorzystuje wygenerowaną siatkę do oceny rezultatów dokowania oraz sprawdzenia czy poszczególne konformacje ligandów nie nakładają się na powierzchnię receptora.
7. Dokowanie – jest to końcowy i kluczowy etap całego opisywanego procesu. Polega on na dopasowywaniu do receptora zadanej cząsteczki liganda. Może to też być wiele ligandów, jeśli w dużym zbiorze cząsteczek szukamy potencjalnego leku. Rozważamy także dwa rodzaje dokowań mikromolekularnych:
  - dokowanie sztywne (*ang. rigid body docking*) – polegające na dopasowywaniu cząsteczek liganda w sposób sztywny do receptora bez jakichkolwiek modyfikacji kątów torsyjnych w ramach liganda;
  - dokowanie elastyczne (*ang. flexible docking*) – najpierw program dokujący identyfikuje sztywne fragmenty liganda (np. pierścienie aromatyczne, wiązania podwójne). Następnie tworzy wiele alternatywnych konformacji liganda modyfikując je np. przez obroty sztywnych fragmentów wokół wiązań pojedynczych. Dzięki temu niektóre ligandy, które początkowo wydawały się zupełnie niepasujące do struktury receptora, dają się dopasować bez żadnych problemów. Oczywiście, w przypadku tej metody należy liczyć się z mocno zwiększoną złożonością obliczeniową tego procesu, gdyż każdy ligand staje się źródłem wielu alternatywnych konformacji.

W niniejszej pracy użyto programu Surflex do wirtualnego badania przesiewowego potencjalnych inhibitorów metylotransferazy ErmC'. Przy wszystkich badaniach przesiewowych jako źródło potencjalnych inhibitorów wykorzystano bazę ligandów Maybridge [132]. Struktura receptora – białka ErmC' została przekonwertowana do formatu pliku mol2. Wykorzystano program Surflex, wersja 1.33. Do wygenerowania protomola zostały użyte reszty aminokwasowe: Thr108, Arg112, Arg134, Arg140, Ser141 oraz Leu142. Do receptora została zadokowana cała baza ligandów Maybridge. Dla każdego liganda tworzone było 10 póż. Do oceny zadokowanych konformacji zostały wykorzystane programy CScore oraz XScore [133].

Program DOCK w wersji 6.1, został wykorzystany do dokowań:

- AdoMet do białka RlmA(I);
- modyfikowanej guanozyny 745 do białka RlmA(I) ze związanym AdoMet;
- AdoMet do białka RlmA(II);
- modyfikowanej guanozyny 748 do białka RlmA(II) ze związanym AdoMet;
- potencjalnych inhibitorów enzymu RlmA(II) w procesie wirtualnego badania przesiewowego;
- modyfikowanej adenozy 1408 z 16S rRNA do białka KamB;
- potencjalnych inhibitorów enzymu NpmA w procesie wirtualnego badania przesiewowego.

We wszystkich wymienionych powyżej dokowaniach z wykorzystaniem programu DOCK do procesu przygotowania receptora oraz liganda został wykorzystany program UCSF Chimera [134]. Użyta została funkcja „Tools -> Structure Editing -> Dock Prep”. Wykorzystane zostało dodawanie wodorów oraz ładunków elektrostatycznych w ramach ww. funkcji. Protonacja histydyn bazowała na nazewnictwie wewnątrz pliku PDB.

Do generowania powierzchni molekularnej we wszystkich przypadkach był wykorzystywany program DMS [135]. Jako rozmiar sfery generującej powierzchnię przyjęto 1,4Å.

Generowanie sfer zostało wykonane programem SPHGEN. Minimalny rozmiar generowanych sfer został ustawiony na 1Å, a maksymalny na 6Å. Zmniejszenie minimalnego rozmiaru pozwoliło na znajdowanie sfer w wąskich fragmentach kieszeni

receptora, natomiast powiększenie zakresu maksymalnego rozmiaru sfery do 6Å pozwoliło na wygenerowanie sfer w miejscach, gdzie kieszeń była bardzo szeroka i trudno było ustalić preferowane położenia atomów potencjalnego liganda. Proces ten był złożony, gdyż oprócz wygenerowania sfer w zadanym rejonie (np. kieszeni na kofaktor w badanym białku) konieczny był ręczny wybór sfer używanych do dokowania. Ręczna ingerencja była konieczna, gdyż sfery generowane są niejednokrotnie w miejscach, o których odgórnie wiadomo, że umiejscowienie liganda jest niemożliwe (jak np. wewnątrz białka) lub niewskazane (sfery po drugiej stronie białka w stosunku do wykorzystywanej kieszeni).

Generowanie siatki odbywało się z wykorzystaniem opcji **bump\_filter = yes** pozwalającej sprawdzać nałożenia atomów.

W przypadku dokowań: AdoMet do RlmA(I), G745 do RlmA(I), AdoMet do RlmA(II), G748 do RlmA(II) oraz A1408 do KamB w pliku wejściowym programu DOCK zmodyfikowane zostały w stosunku do domyślnych parametry:

- liczba orientacji ligandów: **max\_orientations= 500** - większa liczba możliwych konformacji miała służyć zwiększeniu prawdopodobieństwa na znalezienie struktury optymalnej. Większej liczby orientacji nie zastosowano w przypadku wirtualnego badania przesiewowego, w którym ze względu na bardzo dużą liczbę zastosowanych ligandów max\_orientations ustawiono na 200;
- minimalny rozmiar rdzenia w dokowaniu elastycznym: **min\_anchor\_size= 6** (zmniejszenie minimalnego rozmiaru sztywnego rdzenia w dokowaniu elastycznym powoduje, że program może dokonywać większych modyfikacji liganda podczas dokowania, bo już 6 połączonych razem atomów może zostać potraktowanych jako grupa sztywna);
- sprawdzanie nakładania ligandów: **use\_clash\_overlap = yes** oraz **clash\_overlap=0,5**; (opcja pozwala sprawdzać, czy podczas budowy nowej konformacji liganda nie następują zawady steryczne między dodawanymi fragmentami);
- eliminacja zawad sterycznych: **bump\_filter=yes** (sprawdzenie nakładania się liganda na kieszeń receptora).

Oprócz powyższych zmian, przy wirtualnych badaniach przesiewowych zmodyfikowano:

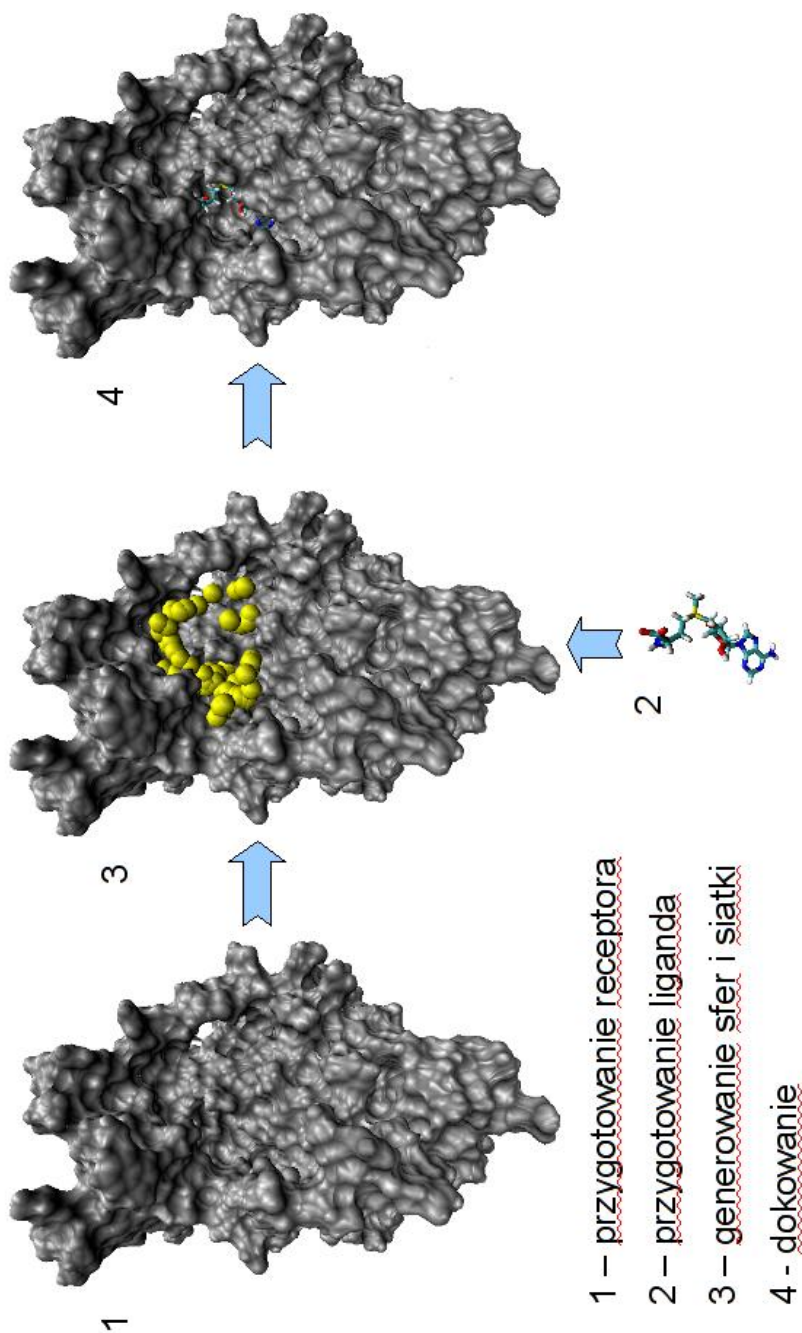
- liczbę dopuszczalnych nałożeń typu van der Waalsa na etapie umiejscawiania rdzenia **max\_bumps\_anchor=6;**
- liczbę dopuszczalnych nałożeń typu van der Waalsa na etapie wzrostu **max\_bumps\_growth=6.**

Powyższe zmiany pozwoliły na eliminację mniej dokładnych rozwiązań, co miało istotne znaczenie dla złożoności czasowej procesu dokowania. Dzięki temu dokowanie było bardziej restrykcyjne, ale przy tak dużej bazie zastosowanych ligandów celem było dobranie parametrów preferujących rozwiązania mocno zoptymalizowane.

Program DOCK do dokowań pojedynczych cząsteczek (AdoMet, GUA, ADE) był używany lokalnie na stacji roboczej wyposażonej w procesor Pentium IV HT. Natomiast wirtualne badania przesiewowe wykonano we współpracy z Wydziałem Matematyki UAM na klastrze 120 komputerów Pentium Dual Core.

Reprezentacja graficzna procesu dokowania mikromolekularnego jest przedstawiona na rycinie 19.

# DOKOWANIE MIKROMOLEKULARNE



Ryc. 19 Schemat dokowania mikromolekularnego.

### 3.3. Dokowanie makromolekularne

W przypadku kompleksów białek czy kwasów nukleinowych metoda omawiana w poprzednim rozdziale nie znajduje zastosowania. Dzieje się tak, ponieważ rozmiar liganda jest znacznie większy i algorytm stosowane w dokowaniu mikromolekularnym powodowałyby bardzo długi czas obliczeń. Konieczne jest zatem zastosowanie metody dokowania makromolekularnego.

Podobnie jak w dokowaniu mikromolekularnym, najlepiej jest wskazać programowi dokonującemu dokowania makromolekularnego, przewidywanego miejsca oddziaływania cząsteczek. Nie zmienia to jednak faktu, że w dokowaniu makromolekularnym możliwe jest utworzenie kompleksu dwóch molekuł bez jakichkolwiek narzuconych więzów na miejsce ich oddziaływania. Przypadki takie zdarzają się, gdy brakuje całkowicie informacji eksperymentalnych o rozpatrywanych związkach, natomiast ich budowa chemiczna nie wskazuje w sposób jednoznaczny, która ich część może brać udział w oddziaływaniu.

Z programów dokonujących dokowania makromolekularnego do użytku w niniejszej pracy został wykorzystany program HADDOCK [136], jako radzący sobie doskonale z kompleksami białek z kwasami nukleinowymi. Program ten przyjmuje jako dane wejściowe, oprócz struktur badanych cząsteczek także plik więzów „airs.tbl” (*ang. Ambiguous Interaction Restraints – AIR*) mówiący o tym, które nukleotydy/reszty aminokwasowe w ramach badanego układu zostają wyznaczone jako aktywne. Przez aktywny nukleotyd rozumiemy taki, który uczestniczy bezpośrednio w badanej reakcji – np. jest modyfikowany przez białko będące drugim składnikiem badanego kompleksu. W pliku więzów określone są także nukleotydy/reszty aminokwasowe pasywne tj. takie, które otaczają wybrane wcześniej aktywne i stanowią miejsce interakcji badanych cząsteczek. W prowadzonych badaniach, jako pasywne wyznaczone były reszty aminokwasowe otaczające kieszenie katalityczne analizowanych enzymów. Program HADDOCK zwraca jako wynik:

1. 1000 struktur po pierwszym etapie dokowania, nie uwzględniającym optymalizacji. Etap ten jest odpowiednikiem sztywnego dokowania mikromolekularnego wykonywanego w próżni.
2. 200 struktur po drugim etapie dokowania. Jest to istotny etap, ponieważ dokonuje się w nim optymalizacji geometrii otrzymanych rezultatów w wodzie. Istnieje również

potencjalna możliwość nadania ruchomości części atomów dokowanych cząsteczek, aby dać im możliwość bardziej ścisłego dopasowania się. Należy jednak liczyć się z faktem, iż ze względu na rozmiar układu nadanie ruchomości części cząsteczek prowadzi do większej złożoności obliczeń. W przypadku dokowań minimalnego substratu RNA do ErmC' oraz helisy 35 do białek RlmA(I) oraz RlmA(II), fragmenty pętli RNA, zawierające modyfikowane nukleotydy były traktowane jako ruchome.

W dokowaniu makromolekularnym za pomocą programu Haddock w etapie końcowym otrzymuje się 200 struktur. Jest to wynik surowy, wymagający dodatkowego klastrowania.

Klastrowanie jest procesem polegającym na podziale struktur na grupy z uwzględnieniem ich wzajemnego stopnia podobieństwa do siebie. W ten sposób struktury najbardziej podobne do siebie znajdują się w jednym klastrze. Natomiast im więcej jest różnic pomiędzy klastrami, tym większa ich odległość od siebie.

Z uzyskanych klastrów analizuje się struktury ocenione najlepiej przez wewnętrzną funkcję oceniającą programu HADDOCK. Dzięki temu można oszacować, jaki rodzaj wzajemnego umiejscowienia dokowanych cząsteczek nam odpowiada. Pozwala to nie brać pod uwagę całych dużych klastrów zawierających struktury, które można uznać za nieprawidłowe lub niespełniające założeń wejściowych eksperymentu. Kończącym działaniem w ramach dokowania makromolekularnego jest selekcja najlepszego rozwiązania z pozostałych klastrów. Zazwyczaj jest to pierwsza (najlepiej oceniona) struktura w tym klastrze.

Pierwszym etapem wykonywanych prac było wyznaczenie reszt aminokwasowych oraz nukleotydów będących w interakcji z drugą cząsteczką kompleksu. Tak wyznaczone reszty aminokwasowe/nukleotydy, jak wspomniano wyżej, nazywa się aktywnymi. W niniejszej pracy zostały wykonane dokowania makromolekularne:

- minimalnego substratu RNA na białko ErmC'. Jako resztę aktywną po stronie białka będącą w interakcji z RNA została wyznaczona Tyr104 natomiast po stronie RNA nukleotydem aktywnym jest modyfikowana A2058;
- helisy 35 z 23S rRNA rybosomu *E. coli* do białka RlmA(I). Resztą aktywną po stronie białka jest Tyr156 natomiast nukleotydem w RNA-G745;
- helisy 35 z 23S rRNA rybosomu *E. coli* do białka RlmA(II). Reszta aktywna to Phe161 w RlmA(II), a aktywny nukleotyd w RNA to modyfikowana G748;

- białka NpmA do podjednostki 30S rRNA. Aktywne reszty aminokwasowe w białku to Trp107 oraz Trp197 natomiast nukleotyd aktywny w 30S rRNA to modyfikowana A1408.

Ze względu na fakt, że przy pomocy programu HADDOCK tworzone były kompleksy białko-RNA zostały wprowadzone modyfikacje plików opisujących cząsteczkę RNA w kompleksie:

- **topology file** = dna-rna-allatom.top;
- **linkage file** = dna-rna.link;
- **energy parameter file** = dna-rna-allatom.param.

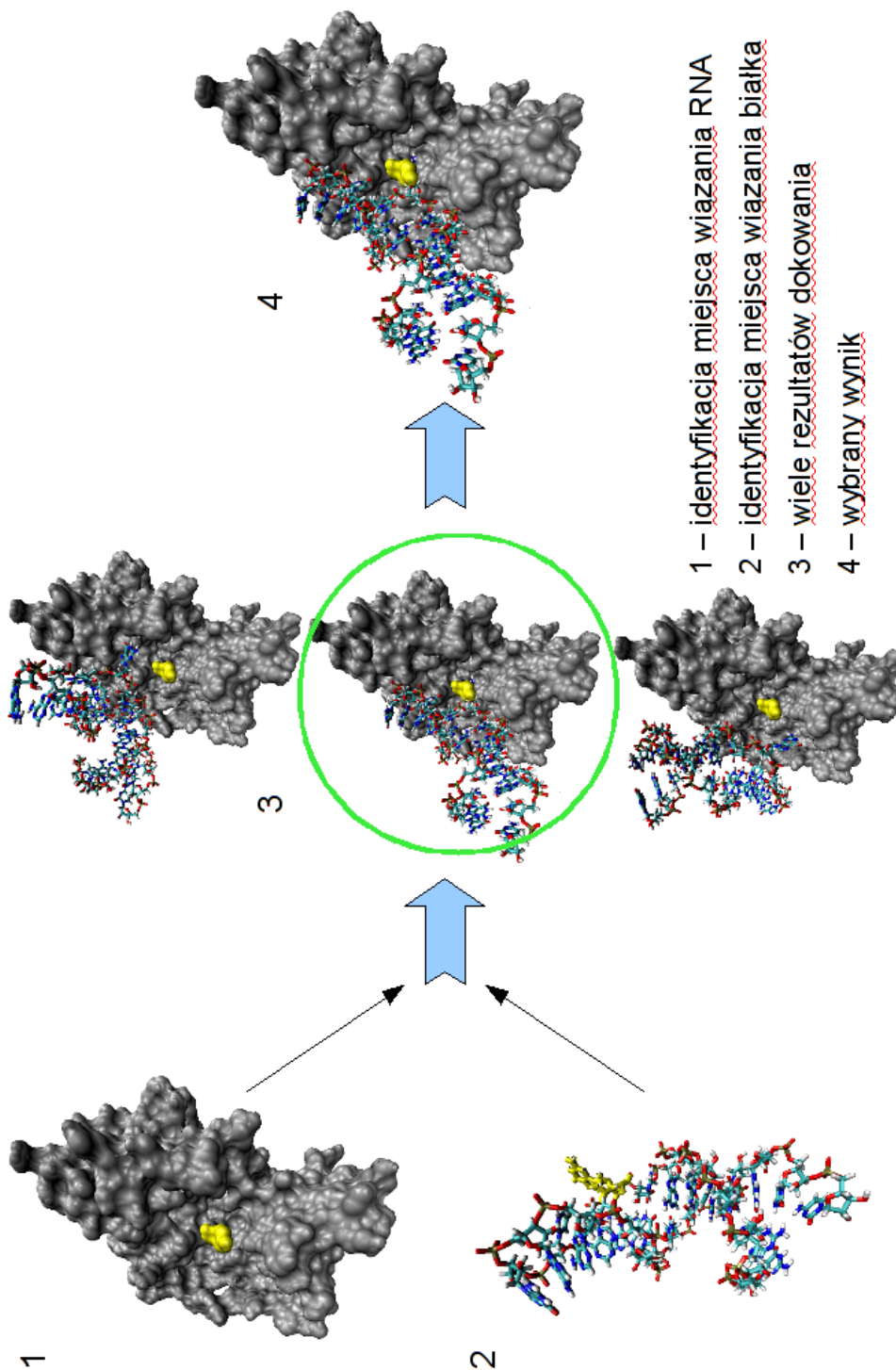
Ustawienia dla białek pozostały domyślne.

Wybór klastrów wygenerowanych przez program HADDOCK w poszczególnych dokowaniach był dokonywany manualnie poprzez porównywanie między sobą rozwiązań reprezentatywnych (najlepiej ocenionych funkcją oceniającą HADDOCK) w poszczególnych klastrach.

Program HADDOCK używany był lokalnie na stacji roboczej wyposażonej w procesor Intel Pentium IV HT. Przy obliczeniach wykorzystywane były oba rdzenie maszyny.

Graficzna reprezentacja dokowania makromolekularnego przedstawiona jest na rycinie 20.

# DOKOWANIE MAKROMOLEKULARNE



Ryc. 20 Schemat dokowania makromolekularnego.

### 3.4. Analiza sekwencji

Analiza sekwencji służy badaniu ewolucji organizmów oraz badaniu grup powiązanych sekwencji. Bywa ona wykorzystywana zarówno w celu sprawdzenia, jakie sekwencje mogą być homologiczne do badanej, jak również sprawdzeniu wcześniej dobranej grupy sekwencji pod kątem ich podobieństwa. W pracy przyrównywane były sekwencje białka RlmA(I) do RlmA(II), białek z rodziny Kam oraz porównania białek Kam i Trm.

W niniejszej pracy, gdy szukano homologów badanych białek, został wykorzystany program BLAST (*ang. Basic Local Alignment Search Tool*) [137] pozwalający wyszukiwać sekwencje homologiczne. Używa on jako wzorca sekwencji analizowanej i znajduje takie sekwencje, które zawierają podobne ciągi reszt aminokwasowych/nukleotydów. Dostępna jest zarówno wersja BLAST z interfejsem sieciowym, jak i lokalna wersja programu.

Zasada działania BLAST przedstawia się następująco:

1. Znajdowany jest fragment sekwencji homologicznej, odpowiadającej sekwencji badanej (długość tego fragmentu, wymagana do uznania przez program BLAST za trafienie {*ang. match*}, jest uzależniona od zdefiniowanej tzw. długości słowa).
2. Następnie program stara się przedłużyć dopasowanie tak długo, jak sekwencja badana zgadza się z homologiem. Czasem mimo pewnych różnic proces przedłużania (elongacji) jest kontynuowany, gdyż mimo punktowych różnic sekwencje mogą po kilku różnych resztach/nukleotydach znów mieć fragmenty podobne.
3. Trafienia są segregowane i zwracane przez program.

Program BLAST umożliwia również badanie sekwencji w różnych aspektach, spośród których w niniejszej pracy wykorzystano m.in.:

- szukanie homologów białkowych dla sekwencji białkowej (blastp);
- szukanie homologów nukleotydowych dla sekwencji nukleotydowej (blastn);
- szukanie białek homologicznych do tego, które koduje znana sekwencja nukleotydowa – (blastx).

### 3.5. Modelowanie homologiczne

Wyróżniamy dwie główne metody modelowania: Boltzmannowską oraz Darwinowską. Pierwsza z nich dotyczy modelowania białek za pomocą zasad fizyki. Jest to jednak metoda bardzo czasochłonna, gdyż wraz ze wzrostem liczby reszt aminokwasowych tworzących białko, drastycznie wzrasta liczba możliwych konformacji, które może ono przyjąć. Metoda Darwinowska polega na przewidywaniu struktur białkowych na podstawie białek homologicznych do badanego i to na niej skupiono się w niniejszej pracy.

Modelowanie homologiczne opiera się na tworzeniu modeli biocząsteczek w oparciu o znane już struktury o podobnej sekwencji bądź też zwoju.

Niniejsza metoda składa się z następujących etapów:

1. Etap wyboru szablonu (*ang. template*), czyli homologa badanego białka o znanej strukturze. Jeżeli nie można takiego znaleźć, dokonuje się przeszukiwania bazy sekwencji np. programem PSI-BLAST [138]. Program ten wykorzystuje początkowo jako wzorzec sekwencję badaną. Jeżeli program znajdzie sekwencje homologiczne, wówczas modyfikuje wzorzec, według którego przeszukuje bazę. Nowym wzorcem staje się sekwencja konsensusowa (badana + homologiczne) i program kontynuuje przeszukiwanie. Pozwala to sformułować ogólny wzorzec charakterystyczny dla danej rodziny białek, minimalizując wpływ modyfikacji u jej poszczególnych członków. Na podstawie struktury szablonu wykonuje się modelowanie struktury celu (*ang. target*). Prawidłowy wybór szablonu jest bardzo istotną częścią całego procesu modelowania.
2. Przyporównanie sekwencji białka modelowanego do szablonu. W ramach tego procesu wprowadzane są modyfikacje, insercje oraz delecje tak, aby odpowiadające sobie reszty aminokwasowe w obu białkach znajdowały się w analogicznych miejscach struktury. Trzeba również zwracać uwagę na to, żeby we fragmentach istotnych strukturalnie np. elementach struktury drugorzędowej nie wprowadzać przerw. Proces ten przeprowadzono w programie Swiss PDB Viewer [139].
3. Dokonywanie reorientacji reszt aminokwasowych celu, różniących się od struktury szablonu, podczas gdy fragmenty analogiczne są kopiowane do końcowego modelu. Powyższa czynność wykonywana jest w programie SWISS-MODEL [139]. Natomiast w programie MODELLER [140] nakładane są więzy przestrzenne na fragmenty struktury szablonu. Następnie struktura jest zwijana w taki sposób, aby

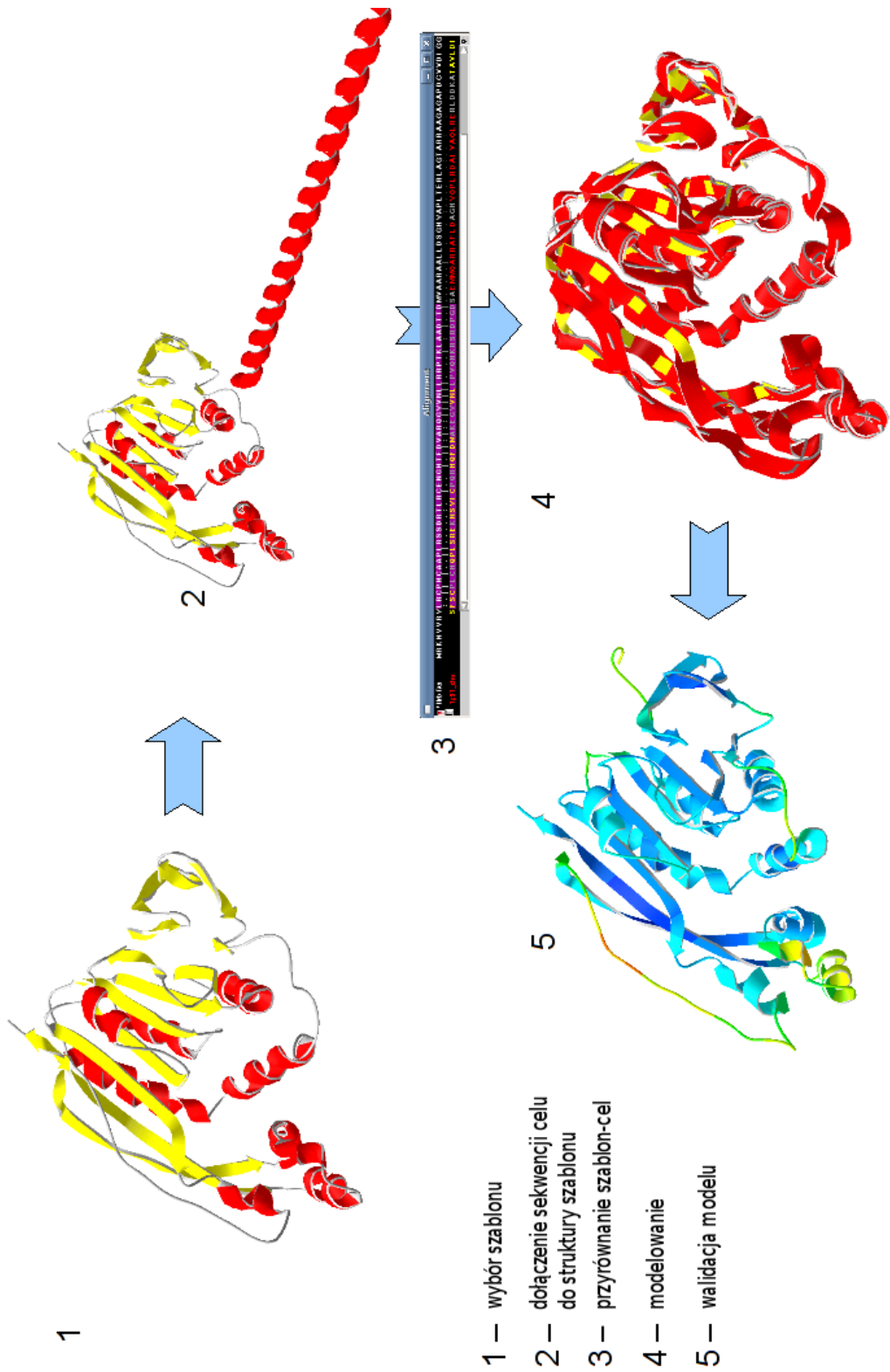
zminimalizować naruszenia tych więzów. W pracy korzystano z obu podejść.

4. Ocena modelu przez specjalnie ku temu przeznaczone programy jak np. Verify3D [141] czy MetaMQAP [142]. Programy te oceniają jak bardzo fragmenty modelu białka przypominają znane struktury występujące w innych białkach (ocena białkopodobności modelu). Sprawdzają między innymi prawidłowość kontekstu strukturalnego poszczególnych reszt aminokwasowych (np. czy reszty hydrofobowe znajdują się wewnątrz struktury białka). Metody te zwracają łatwy do oceny wizualnej model badanej cząsteczki. Do pliku struktury modelu wpisują do kolumny „B-factor” ocenę dla każdej reszty aminokwasowej. Dzięki temu programy do wizualizacji kolorują kawałki cząsteczki ocenione jako nieprawidłowo wymodelowane na czerwono, a prawidłowo wymodelowane na niebiesko (pomiędzy wspomnianymi kolorami występuje wiele odcieni świadczących o ocenie białkopodobności danego fragmentu).

W przypadku, gdy w punkcie 4 powyższego procesu otrzymywany jest model niespełniający stawianych mu wymagań (np. czerwony fragment kieszeni ważnej dla funkcji białka), konieczne jest ponawianie różnych etapów powyżej opisanego procesu modelowania np. dodatkowy szablon, optymalizacja przyrównania. Trzeba też brać pod uwagę, iż w wielu przypadkach pętle w modelowanej cząsteczce będą pokolorowane na czerwono, ale ze względu na ich mobilność można czasem taki wynik uznać za dopuszczalny. Proces modelowania homologicznego przedstawiony jest na Ryc.21.

Metoda modelowania homologicznego została wykorzystana w niniejszej pracy do stworzenia modelu białka RlmA(II). Jako szablonu użyto homologicznego białka RlmA(I) o znanej strukturze krystalograficznej (kod PDB: 1P91). Proces przyrównania badanej sekwencji do sekwencji szablonu wykonano z użyciem programu SWISS PDB VIEWER. Stworzony projekt PDB został wykorzystany do modelowania z użyciem programów SWISS - MODEL oraz MODELLER. Proces modelowania był utrudniony z uwagi na istnienie w białku RlmA(II) długiej pętli między resztami aminokwasowymi 197 a 215 (sekwencja: GLLRVRDHKEGRLAEQLAPH), która nie występuje w szablonie. Uzyskane modele zostały ocenione metodą MetaMQAPII.

# MODELOWANIE HOMOLOGICZNE



Ryc. 21 Schemat modelowania homologicznego.

### 3.6. Modelowanie pętli metodą ROSETTA

Jako metodę wspomagającą modelowanie homologiczne został wykorzystany program ROSETTA [143]. Obecne metody modelowania białek mają znaczne ograniczenia, w przypadku większych fragmentów struktur, dla których nie ma dostępnego szablonu, jak to miało w przypadku pętli 197-215 w białku RlmA(II). Mimo, że radzą sobie z krótkimi pętlami, dłuższe nadal pozostają poważnym problemem.

ROSETTA korzysta z bazy znanych struktur białkowych. Metoda ta tworzy modele, składając je z 3- lub 9-aminokwasowych wycinków znanych białek z powyższej bazy. Modele utworzone z ww. wycinków są optymalizowane są przez program ROSETTA metodą Monte Carlo [144].

Dokładność tworzonych fragmentów maleje wraz ze wzrostem długości fragmentu, gdyż zwiększa się lawinowo liczba możliwych konformacji łańcucha białkowego.

Programem ROSETTA wymodelowano pętlę 197-215 w białku RlmA(II). Następnie uzyskana struktura została oceniona programem MetaMQAPII.

### 3.7. Modelowanie struktur kwasów nukleinowych metodą MCSym

W pracy do wymodelowania finalnej struktury minimalnego substratu RNA został wykorzystany program MCSym [145] w wersji 3.2.2. Jest to oprogramowanie pozwalające na tworzenie struktur trójwymiarowych cząsteczek białek oraz kwasów nukleinowych na podstawie narzuconych więzów na strukturę drugorzędową przewidywanej cząsteczki.

Jako parametr wejściowy dla programu została użyta sekwencja minimalnego substratu RNA: CGCGACGGACGGAAAGACCCCUAUCCGUCGCG (modyfikowana adenozyzna została pogrubiona). Następnie narzucone zostały znane więzy przestrzenne dotyczące substratu (Ryc. 22).

```
>ermc
CGCGACGGACGGAAAGACCCCUAUCCGUCGCG
((((((((((.(.....))..))))))))))
```

Ryc. 22 Więzy przestrzenne struktur 2D minimalnego substratu RNA w programie MCSym.

W wyniku działania programu otrzymano 1000 modeli struktury minimalnego substratu RNA. Struktury zostały nałożone na siebie z użyciem programu PyMOL [146]. Następnie nałożone struktury sklastrowano przy pomocy skryptu stworzonego w języku programowania Python [147]. Uzyskany reprezentatywny model przedstawiony jest w rozdziale Wyniki.

### **3.8. Programy do wizualizacji**

W toku działań związanych z przeprowadzaniem różnych etapów projektów wykorzystywane były programy do wizualizacji pozwalające na dokonywanie licznych manipulacji z danymi związanymi z niniejszą pracą.

Programy PyMOL [146], VMD[148] oraz UCSF Chimera [134] są używane zarówno do wizualizacji cząsteczek, jak i tworzenia wysokich jakościowo rysunków.

PyMOL umożliwia zapisanie wielu plików PDB do jednego pliku projektowego, co znacznie ułatwia pracę z dużymi zbiorami danych. Dzięki temu istnieje możliwość wizualizacji rezultatów dokowania mikromolekularnego z uwzględnieniem wszystkich uzyskanych konformacji w ramach jednego pliku projektowego.

W PyMOLu oraz VMD można odtwarzać trajektorie dynamiki molekularnej. Programy te dają również możliwość rozszerzenia funkcjonalności ich działania przez dodawanie skryptów np. w języku Python w PyMOLu czy Tcl/Tk w VMD. Dużą zaletą PyMOLa oraz VMD jest to, że istnieje opcja samodzielnego pisania dodatków rozszerzających ich funkcjonalność z wykorzystaniem powszechnie dostępnego i popularnego języka programowania Python.

Dużą zaletą VMD jest jego sprzężenie z pakietem NAMD [149] służącym do przeprowadzania dynamiki molekularnej.

Z kolei UCSF Chimera umożliwia wygodne przygotowanie cząsteczek do procesu dokowania mikromolekularnego dzięki gotowym narzędziom „Dock Prep”, przeprowadzającym potrzebne kalkulacje.

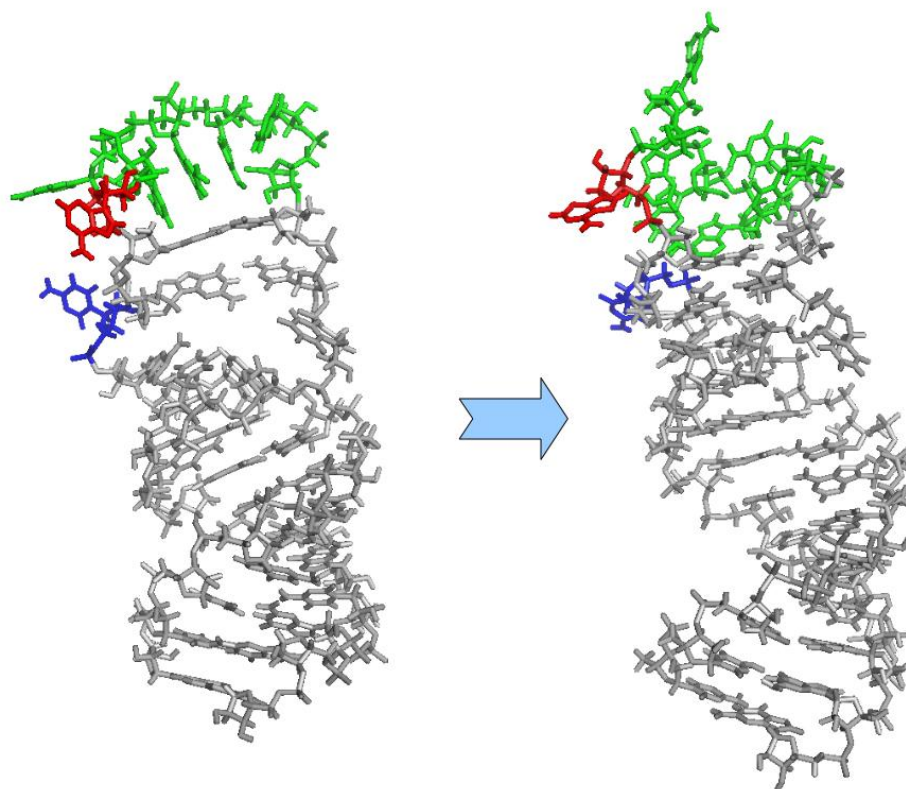
## 4. Wyniki

### 4.1. Metylotransferazy modyfikujące 23S rRNA

#### 4.1.1. Metylotransferaza ErmC' modyfikująca N6 w A2058 z 23S rRNA

##### 4.1.1.1. Minimalny substrat RNA dla ErmC'

Na rycinie 23 zostały przedstawione struktury trójwymiarowe minimalnego substratu RNA, przed (Ryc.23A) i po (Ryc.23B) symulacji dynamiki molekularnej trwającej 3,2 ns.



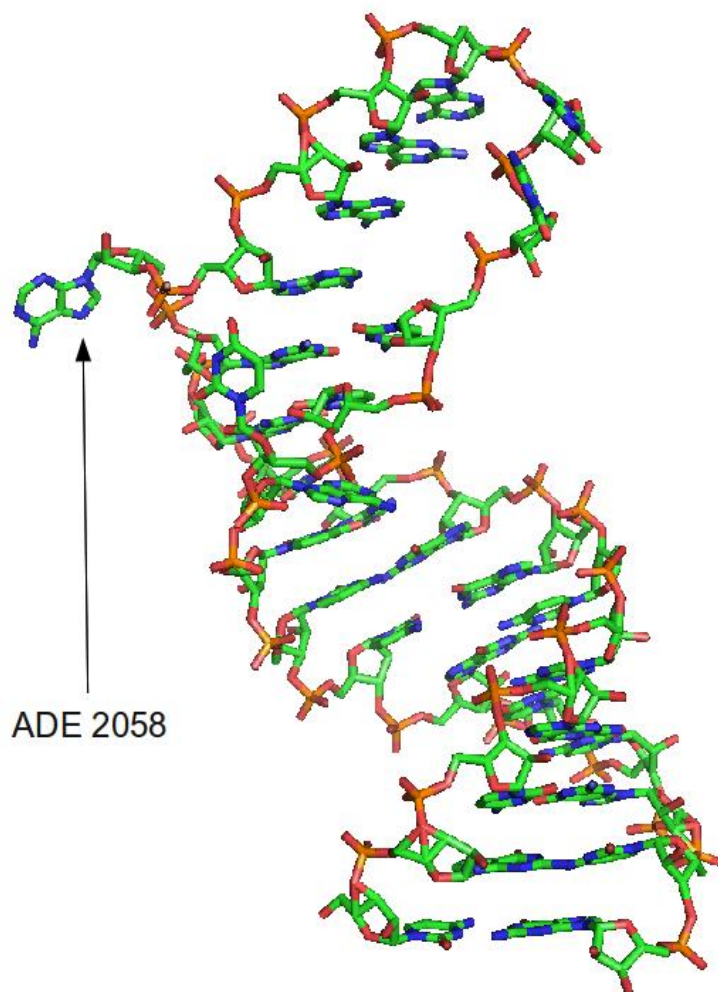
A

B

Ryc.23 Pierwotny substrat RNA [66] przed (Ryc.23A) oraz po (Ryc.23B) symulacji dynamiki molekularnej o długości 3,2 ns. Na czerwono zaznaczona została modyfikowana adenozyzna 2058. Na niebiesko cytozyna 2055 tworząca wybrzuszenie pomiędzy fragmentami helikalnymi substratu. Na zielono – pozostałe nukleotydy oprócz A2058 tworzące pętlę w substracie.

W trakcie symulacji nastąpiły przesunięcia parowań nukleotydów w krótkiej części helikalnej-dwunukleotydowej oddzielającej wybrzuszenia od pętli. Przesunięcia te spowodowały zaburzenie globalnego kształtu całego substratu (Ryc.23). RMSD wyniosło przy końcu symulacji 5Å. Występowanie tak dużych zmian w strukturze cząsteczki wskazuje, że jest to cząsteczka bardzo labilna, która może okazać się trudna do analizy bioinformatycznej. Niestabilność tej cząsteczki może także sugerować, że struktura przestrzenna tego wstępnego modelu nie pokrywała się z rzeczywistością.

Ze względu na wysoką labilność badanego RNA skonstruowane zostało kilka struktur przestrzennych niniejszego substratu z wykorzystaniem programu MCSym, który przeprowadza równocześnie optymalizację przestrzenną stwarzanego modelu, dzięki której wiadomo, że uzyskany model poddany procesowi minimalizacji pozostanie stabilny. Reprezentatywny model, wykazujący stabilność strukturalną w procesie minimalizacji przedstawiony jest na rycinie 24.



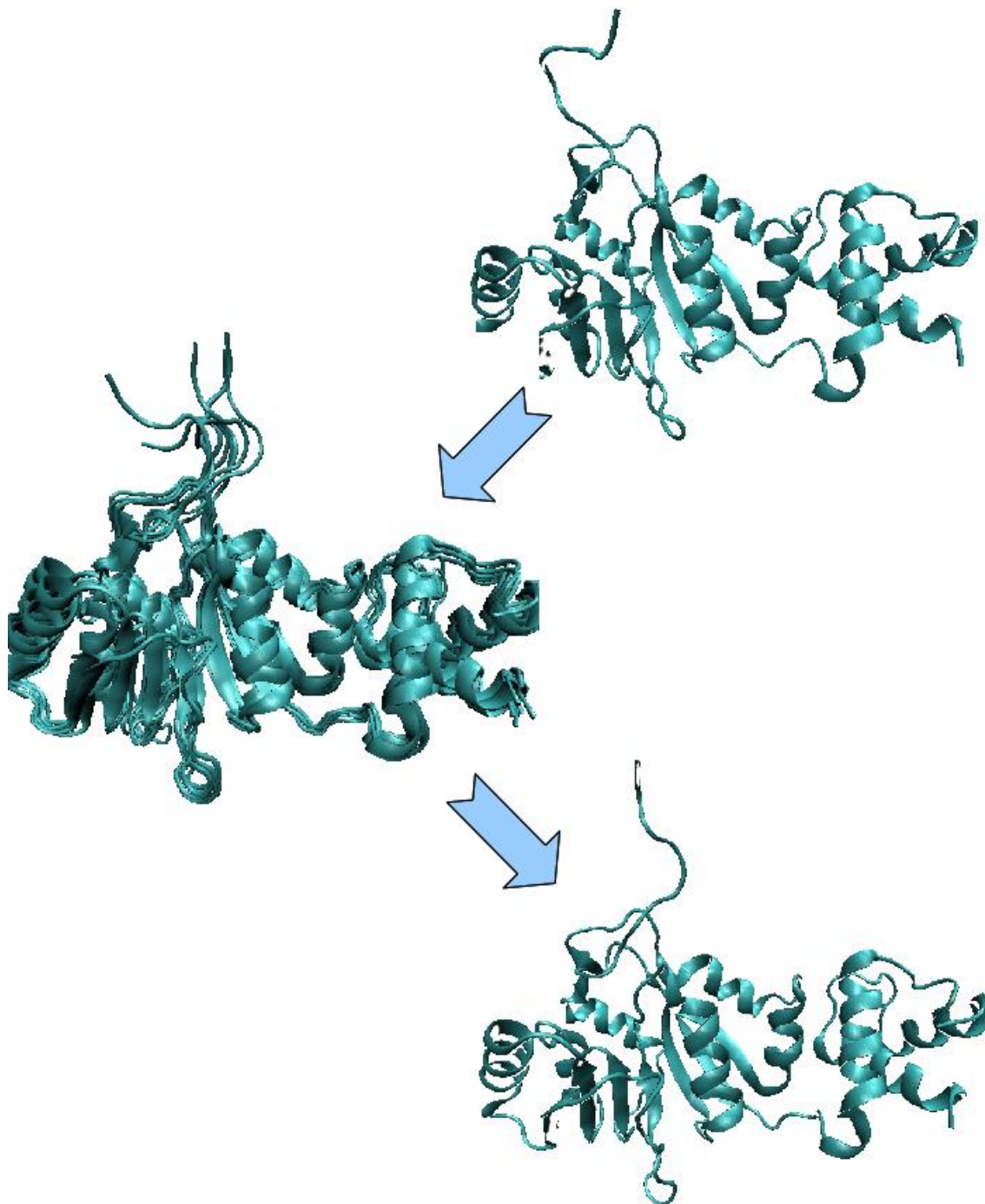
Ryc.24 Końcowy model minimalnego substratu RNA uzyskany programem MCSym. Powyżej ADE2058 jest widoczna pętla, poniżej – część helikalna substratu.

#### **4.1.1.2. Analiza białka *ErmC'***

Przeprowadzono również analizę stabilności białka *ErmC'* za pomocą dynamiki molekularnej oraz analizy wektorów własnych opisujących kierunki, w których następują ruchy oscylacyjne atomów badanej cząsteczki.

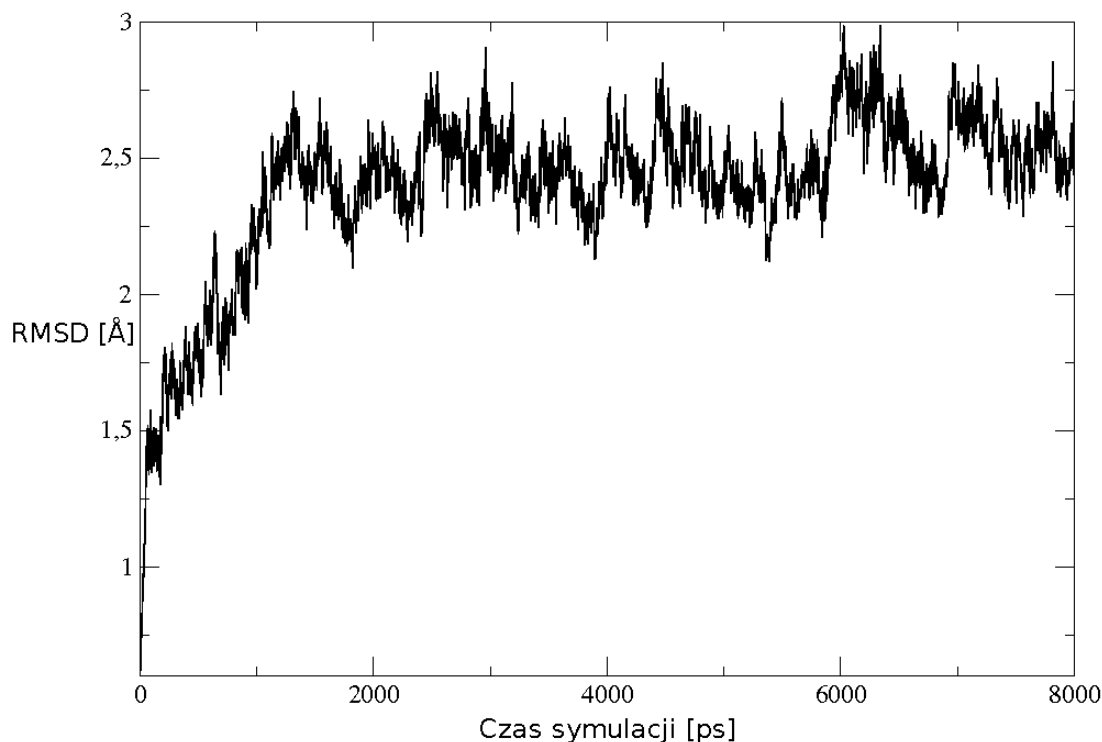
Białko *ErmC'* w analizie przy pomocy dynamiki molekularnej, w przeciwieństwie do minimalnego substratu RNA okazuje się być bardzo stabilne. Istnieją niewielkie oscylacje oraz ruchy międzydomenowe w białku, ale końcowa struktura globalna jest bardzo zbliżona do początkowej. Jedyne koniec N białka wykazuje wysoką labilność, co nie dziwi, gdyż nie występuje on strukturze krystalograficznej. Struktura ta została wymodelowana przez prof. Bujnickiego.

Z przebiegu dynamiki enzymu ErmC' nie daje się zaobserwować istotnych zmian strukturalnych. Jednakże w trakcie tego badania wyżej wymienione białko podlega wielu ruchom globalnym (Ryc.25).



Ryc.25 Przebieg symulacji dynamiki molekularnej białka ErmC'. Od góry – konformacja początkowa, szereg konformacji pośrednich, konformacja końcowa.

Dzięki wykresowi RMSD (Ryc. 26) widać, że białko po początkowych niewielkich zmianach konformacyjnych jest stabilne.



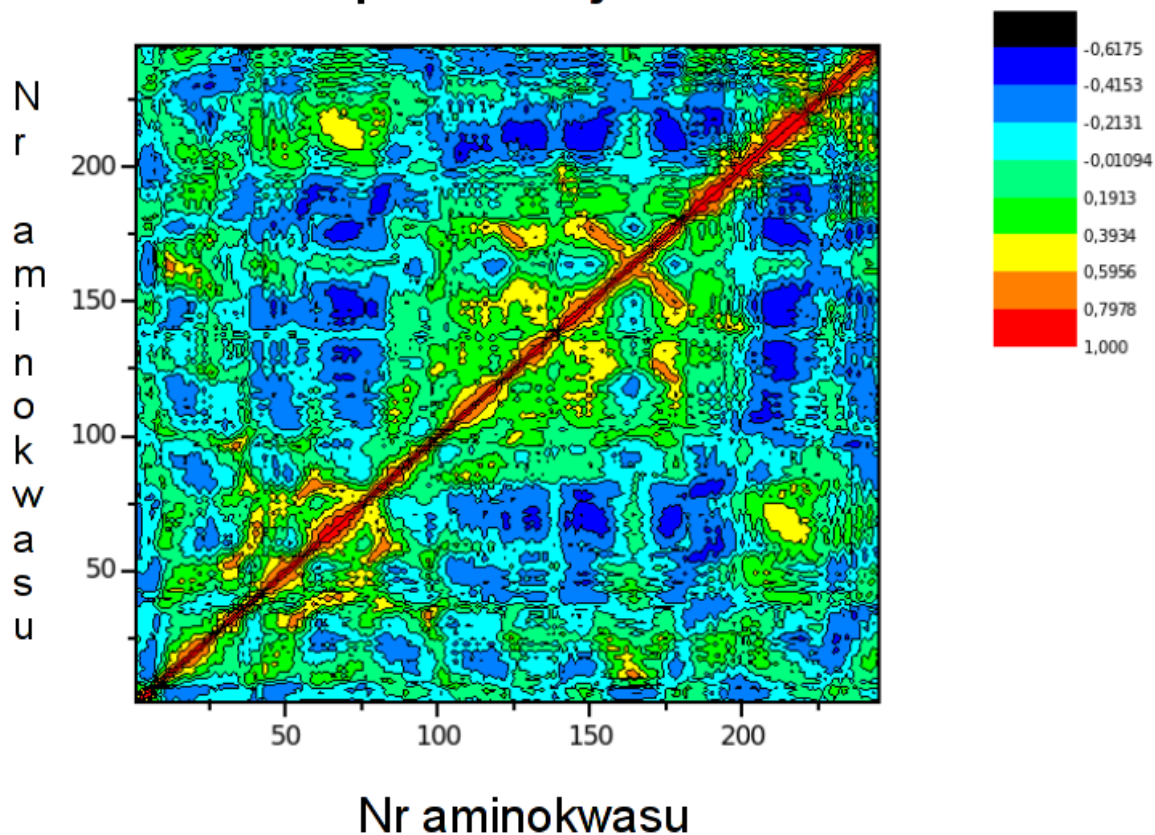
Ryc. 26 RMSD białka ErmC' podczas symulacji dynamiki molekularnej.

Sama obserwacja trajektorii enzymu ErmC' nie udziela jednak odpowiedzi na pytanie, jaki jest charakter tych drgań, gdyż następuje ich wiele w tym samym czasie. Natomiast macierz kowariancji (zwana też mapą korelacji) dostarcza informacji odnośnie zmienności położenia poszczególnych reszt aminokwasowych w tym białku (Ryc.27).

### **Analiza korelacji ruchów w białku ErmC'**

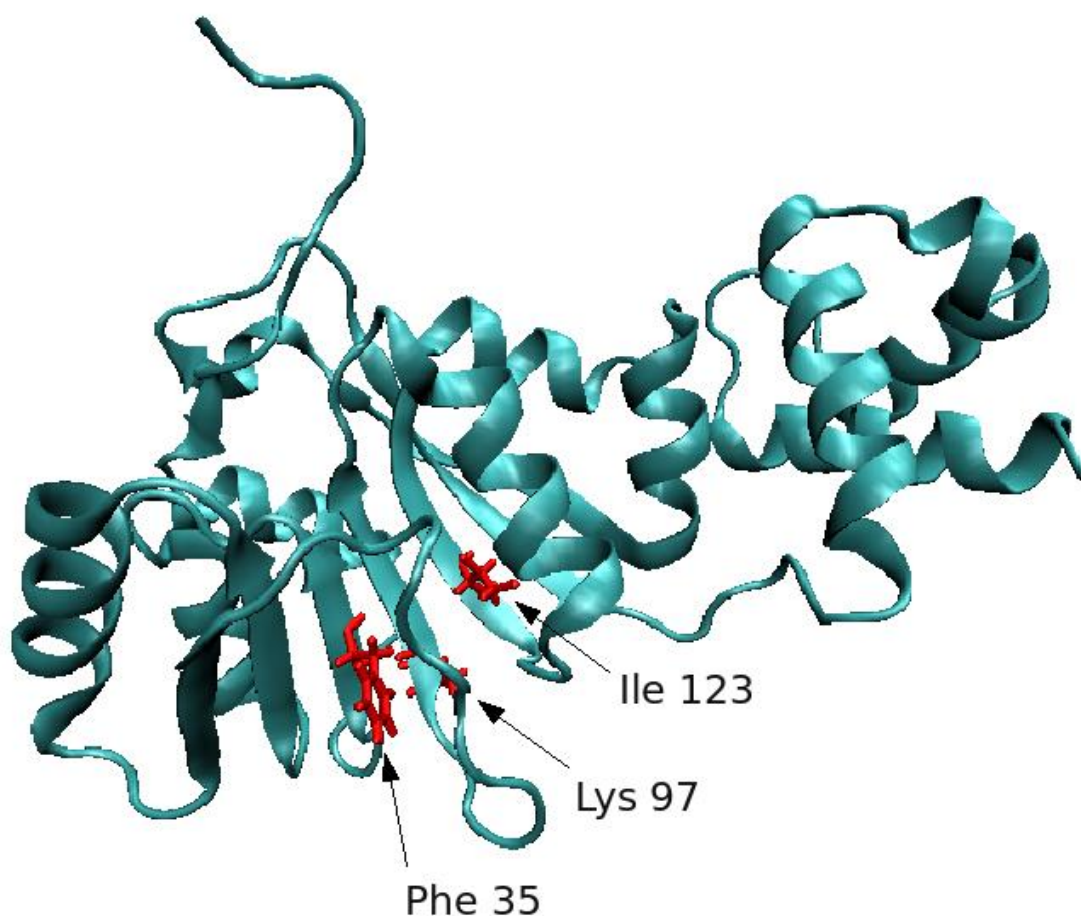
Korelacje pozytywne wskazują na homogeniczność i silne powiązania pewnych fragmentów badanej cząsteczki. Z kolei zależności negatywne są o tyle istotne, że umożliwiają ukazanie ruchów powodujących np. otwieranie się i zamykanie kawałka białka przez co wskazać mogą rejony istotne dla wiązania się substratu.

## Mapa korelacji ErmC



Ryc.27 Mapa korelacji pomiędzy resztami w białku ErmC'. Kolory od zielonego do czerwonego oznaczają coraz silniejszą korelację pozytywną pomiędzy poszczególnymi resztami aminokwasowymi. Pozytywna korelacja ruchów reszty A i B oznacza, że reszta B będzie w tym samym momencie trajektorii przemieszczała się w tym samym kierunku co reszta aminokwasowa A. Korelacja negatywna symbolizowana jest przez coraz silniejsze odcienie niebieskiego. W jej przypadku ruch reszty A skorelowanej negatywnie z B będzie implikował, iż w danej chwili czasu reszta aminokwasowa B porusza się w przeciwną stronę do ruchu reszty A.

Stuprocentową korelację pozytywną, a więc czystą czerwoną barwę mają korelacje reszt aminokwasowych z sobą samymi. Z powyższej macierzy obserwowalne jest kilka opisywanych dalej zależności.

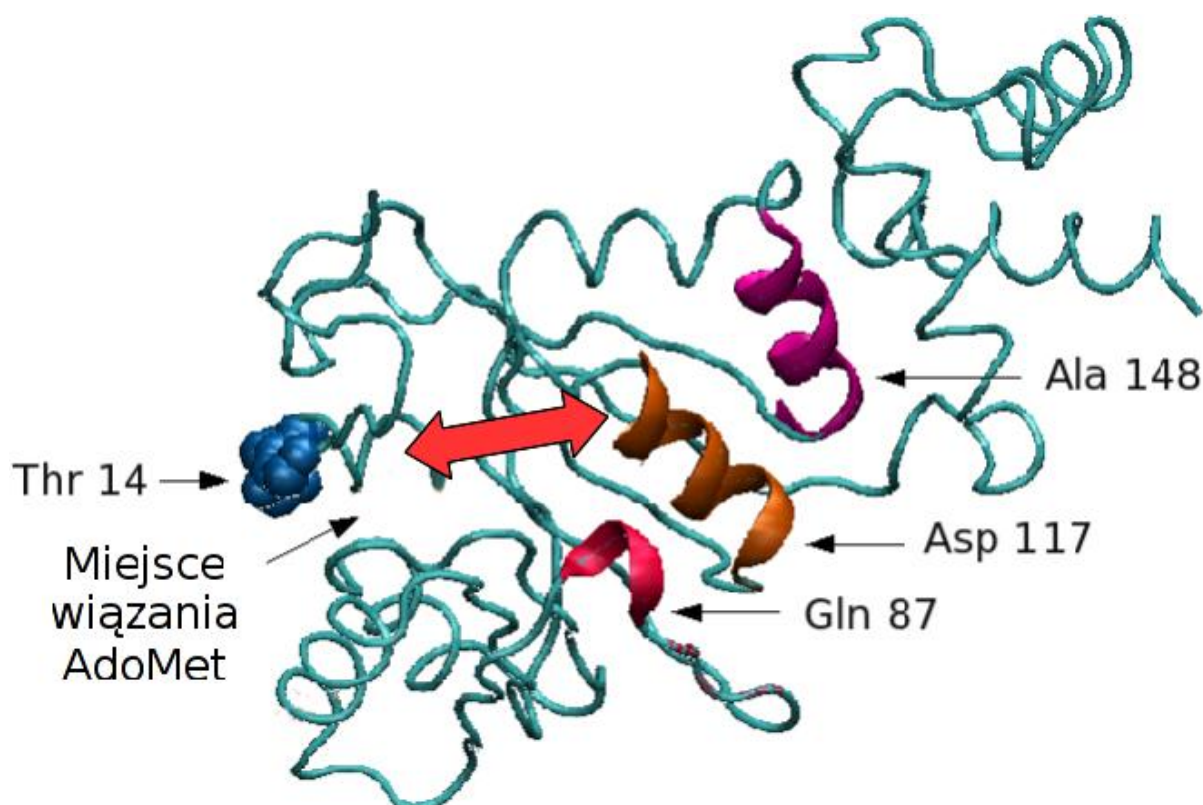


Ryc.28 Korelacja pozytywna Phe35 z Lys97 i Ile123.

Korelacja pozytywna na Ryc.28 wskazuje na oddziaływania występujące pomiędzy poszczególnymi resztami aminokwasowymi, wchodzącymi w skład arkusza  $\beta$ , będącego rdzeniem domeny N-końcowej białka ErmC'. Zależność ta wskazuje na fakt spójności ruchów rdzenia domeny.

W dalszej analizie skupiono się jednak na badaniu korelacji bardziej istotnych z punktu widzenia skoncentrowanego na wiązaniu RNA do tego białka tj. na korelacjach negatywnych.

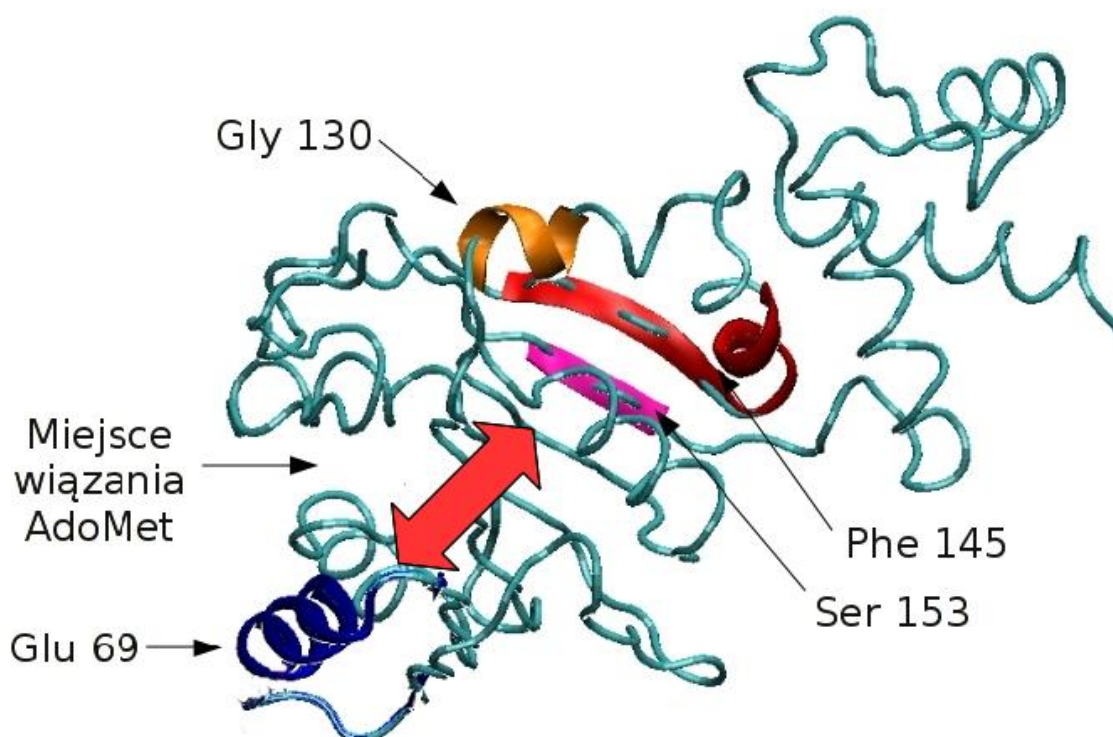
Analizując szczegółowo powyższą mapę korelacji zaobserwowane zostały następujące zależności: Thr 14 oddziałuje negatywnie z Gln 87, Asp 117 i Ala 148. Zatem ruch Thr14 w jedną stronę będzie sprzężony z ruchami Gln87, Asp117 oraz Ala148 w przeciwną stronę.(Ryc.29).



Ryc.29 Korelacja negatywna Thr14 z resztami Gln87, Asp117 oraz Ala148. Czerwona strzałka oznacza wektor własny wzdłuż którego następuje ruch reszt aminokwasowych względem siebie.

Wskazane zostało również miejsce wiązania donora grupy metylowej. Na rycinie 29 widać, że oddziaływania te przecinają kieszeń wiążącą AdoMet. Sugeruje to, że wzajemne oddziaływanie tych reszt powoduje zamykanie i otwieranie kieszeni wiążącej kofaktor, umożliwiając jego związanie bądź też uwolnienie.

Kolejna rycina ukazuje negatywne korelacje ruchu Glu69 a reszt Gly130, Phe145 oraz Ser153. Jak widać z przedstawionej poniżej reprezentacji graficznej, jest to ponownie oddziaływanie przechodzące przez miejsce wiązania donora grupy metylowej. Udowadnia to, że miejsce to jest bardzo dynamiczne.

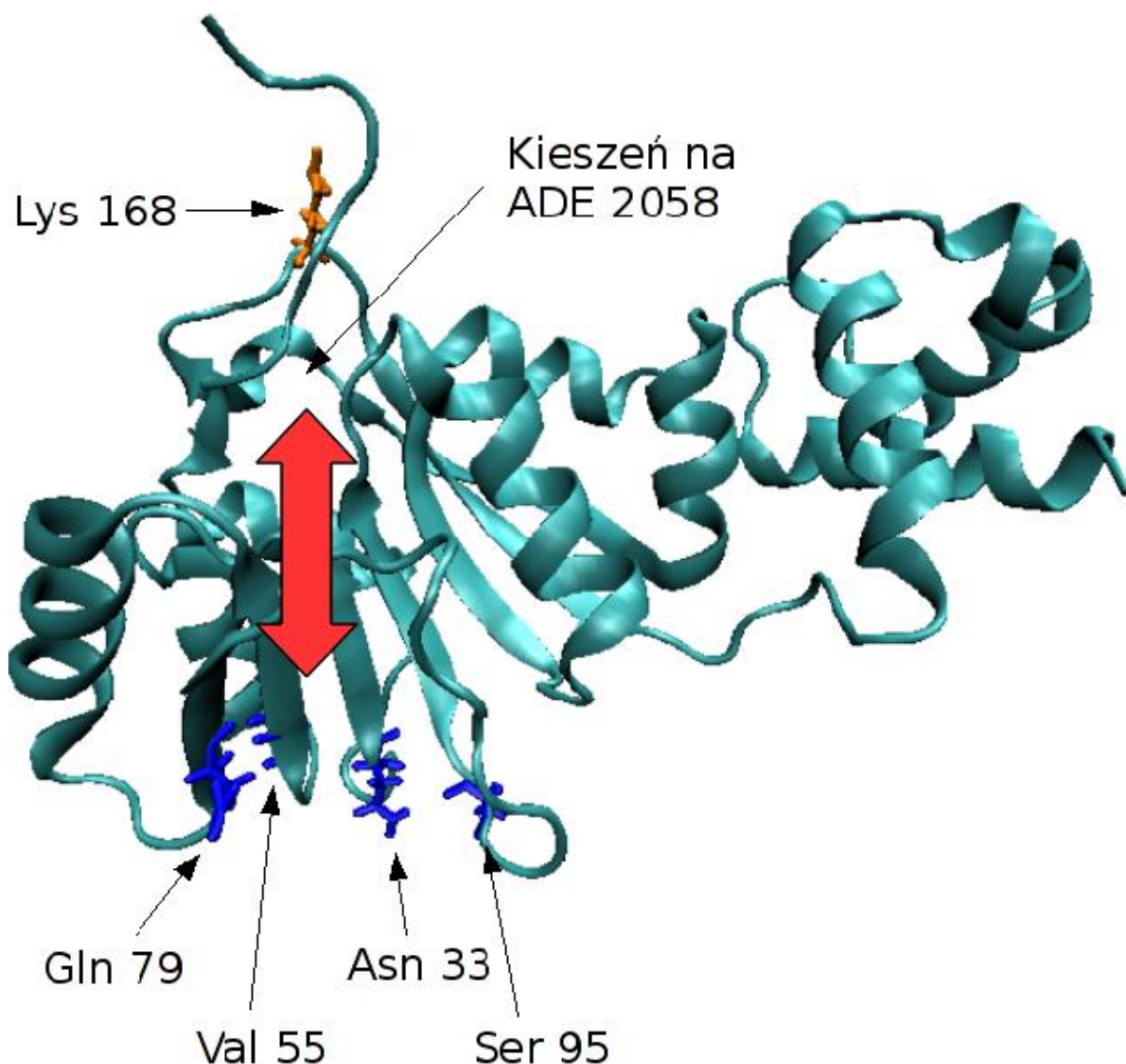


Ryc.30 Korelacja negatywna ruchu Glu69 z grupą reszt Gly130, Phe145 i Ser153. Czerwona strzałka oznacza wektor własny wzdłuż którego następuje ruch reszt aminokwasowych względem siebie.

Powyższe wyniki (Ryc.29 i Ryc.30) wskazują na wyraźną tendencję kompresji i otwierania się kieszeni wiążącej kofaktor w białku ErmC'. Strzałki uwidaczniające oddziaływania pomiędzy wyszczególnionymi resztami aminokwasowymi pokazują lokalizację istotnego rejonu w białku jakim jest ww. kieszeń.

W etapie dalszych prac skupiono się na kluczowym z punktu widzenia niniejszych badań miejscu wiązania modyfikowanej przez enzym ErmC' adenozy (A2058).

Kolejnym oddziaływaniem negatywnym zaobserwowanym z analizy macierzy kowariancji była zależność negatywna między Lys 168 a aż czterema resztami aminokwasowymi po przeciwnej stronie domeny N-końcowej tj. Asn 33, Val 55, Gln 79 oraz Ser 95. Gdyby pomiędzy wymienionymi resztami aminokwasowymi przeprowadzić linie obrazujące ich oddziaływania, można by zaobserwować, że przebiegają one w miejscu wiązania modyfikowanego nukleotydu (Ryc.31). Wskazuje to na mechanizm podobny do zamykania i otwierania kieszeni na donor grupy metylowej.

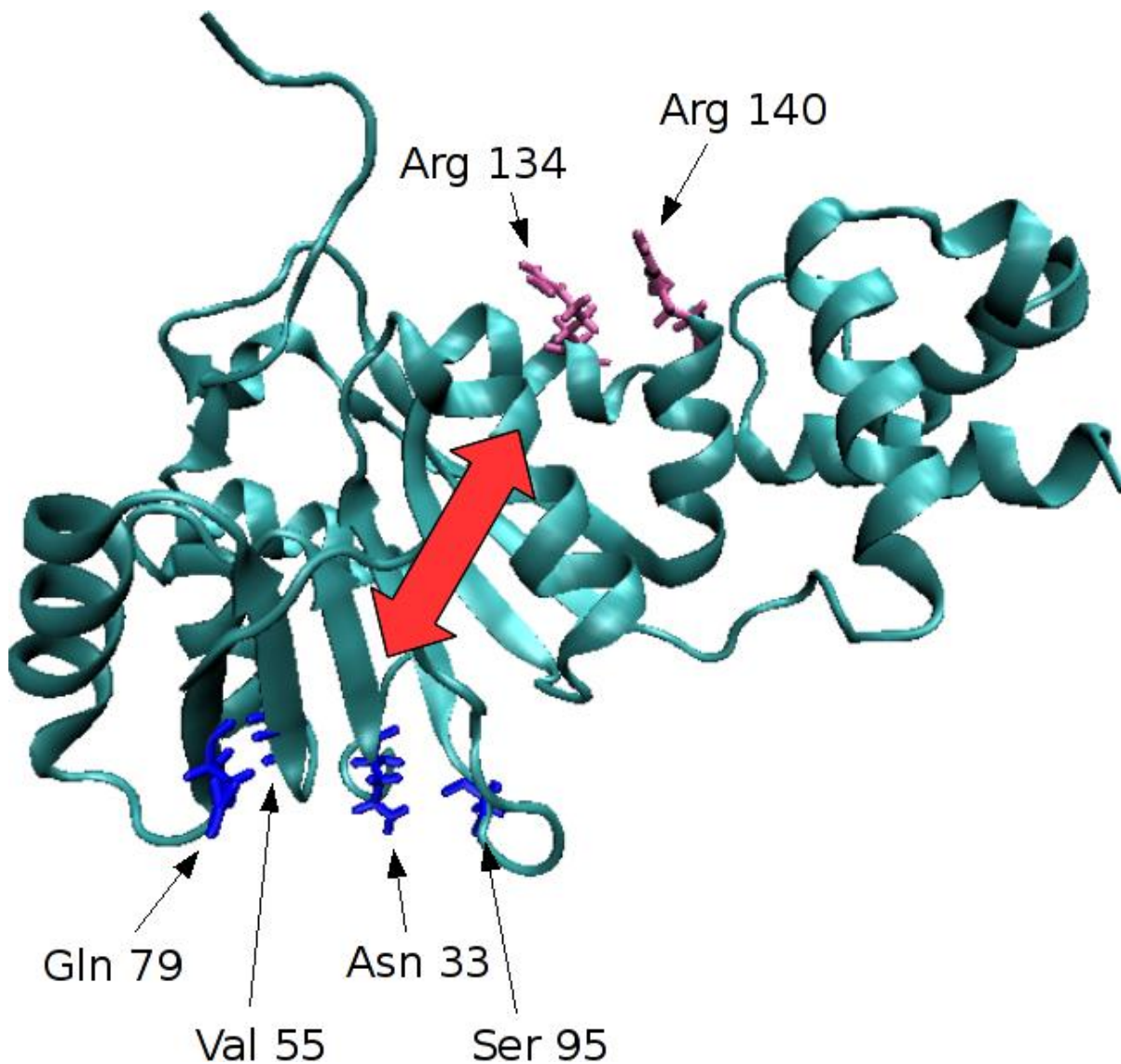


Ryc.31 Korelacja negatywna Lys168 z Asn33, Val55, Gln79 i Ser95. Czerwona strzałka oznacza wektor własny wzdłuż którego następuje ruch reszt aminokwasowych względem siebie.

W toku dalszych badań zauważona została jeszcze jedna ciekawa zależność. Mianowicie reszty korelujące z Lys 168, tzn. Asn 33, Val 55, Gln 79 oraz Ser 95 korelują również negatywnie z dwoma innymi resztami aminokwasowymi tj. Arg 134 oraz Arg 140 (Ryc.32).

W strukturze ErmC' Arg 134 oraz Arg 140 występują w bardzo specyficznym położeniu, tj. znajdują się blisko granicy domen, a ich łańcuchy boczne wystają w stronę roztworu, prostopadle do powierzchni białka. Z przeprowadzonych badań wynika, że reszty te są istotne dla wiązania RNA [76].

W związku z powyższym można mniemać, iż Arg 134 oraz Arg 140 w ramach korelacji negatywnej z Asn 33, Val 55, Gln 79 oraz Ser 95, zbliżają się łańcuchami bocznymi do powierzchni białka, umożliwiając związanie się modyfikowanej helisy RNA.

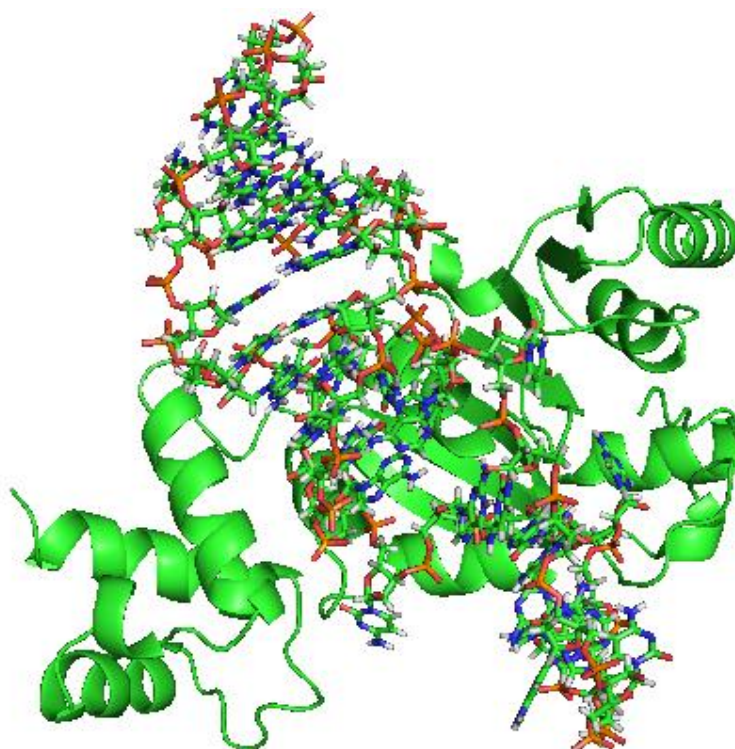


Ryc.32 Korelacja negatywna Arg134 i Arg140 z Asn33, Val55, Gln79 i Ser95. Czerwona strzałka oznacza wektor własny wzdłuż którego następuje ruch reszt aminokwasowych względem siebie.

#### 4.1.1.3. Analiza kompleksu *ErmC'*-RNA

W toku dalszych badań przeprowadzona została symulacja kompleksu enzymu *ErmC'* razem z ww. minimalnym substratem RNA. Struktura startowa dla tego kompleksu została wymodelowana przez prof. Janusza Bujnickiego i współpracowników [66].

Początkowa trójwymiarowa struktura kompleksu przedstawiona została na rycinie 33.

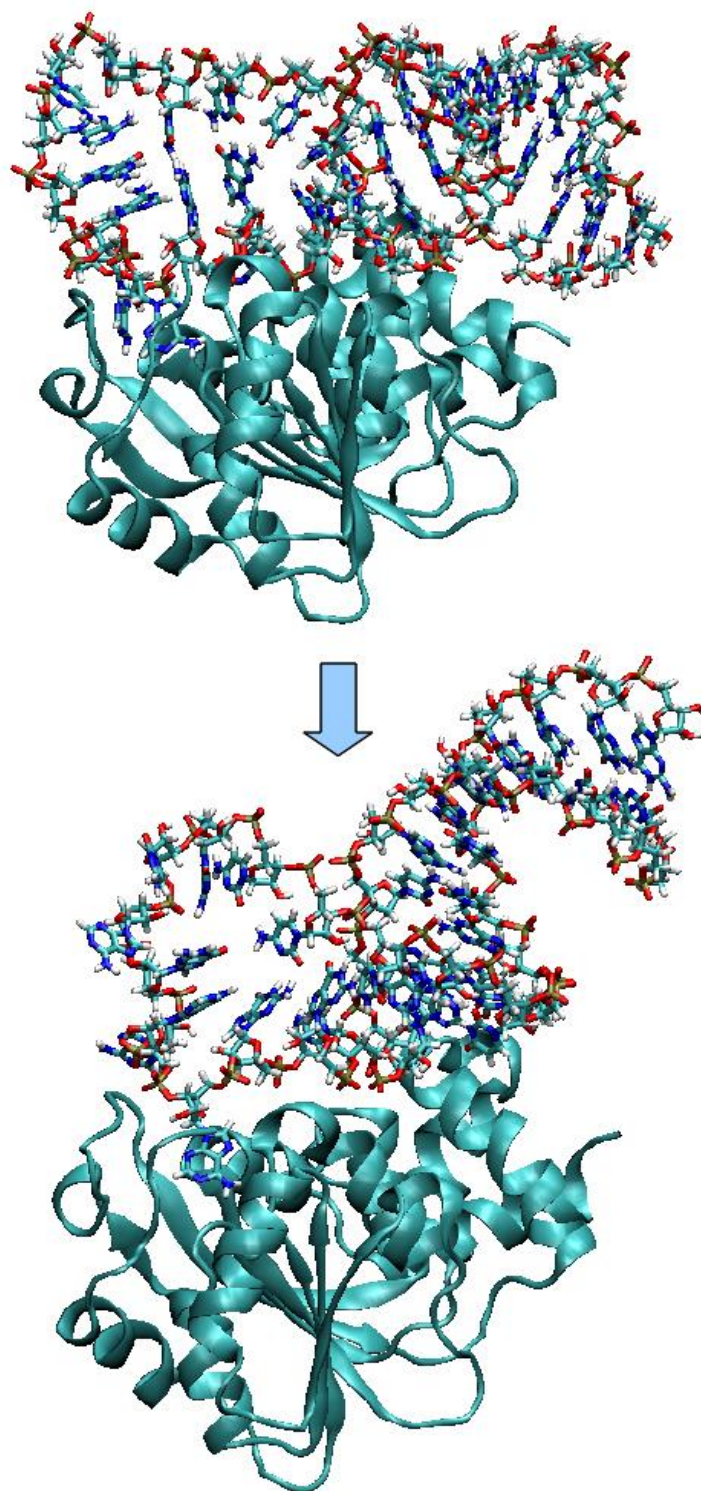


Ryc.33 Wstępna struktura kompleksu białko ErmC' z minimalnym substratem RNA.

Jest to ułożenie wskazujące na umiejscowienie się RNA poprzecznie do białka na styku domeny N-końcowej z C-końcową.

W trakcie dynamiki molekularnej następowały zmiany konformacyjne kompleksu uwidocznione na rycinie 34.

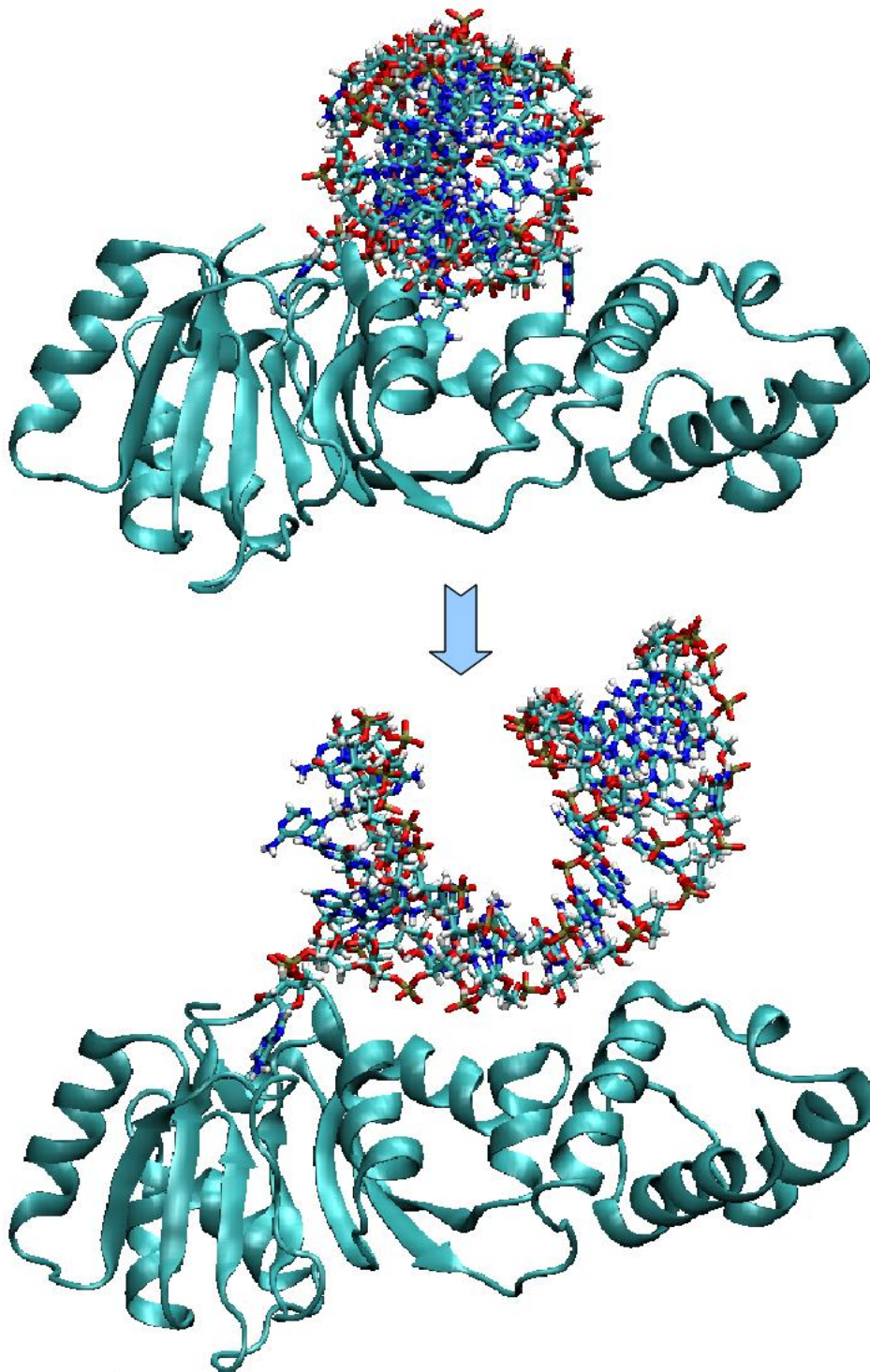
*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*



Ryc.34 Dynamika molekularna kompleksu ErmC' z minimalnym substratem RNA.

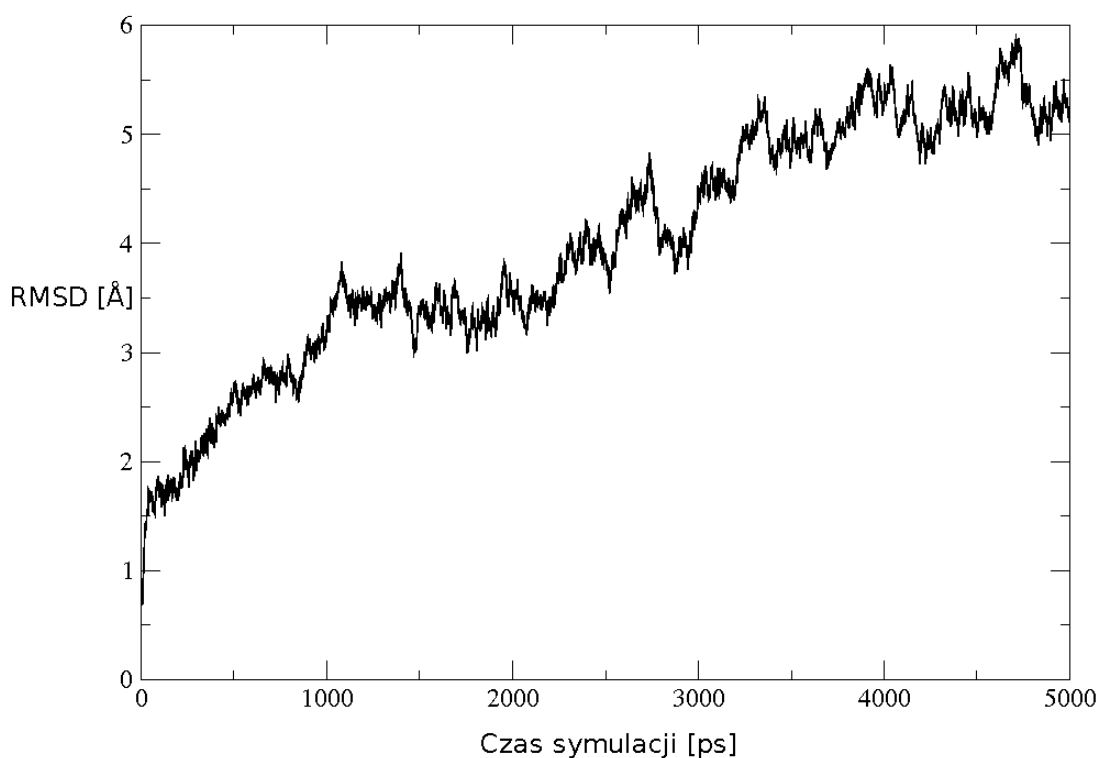
*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*

Patrząc z innej perspektywy można zauważyć, że nastąpiła istotna reorientacja RNA względem białka (Ryc.35):



Ryc.35 Reorientacja RNA względem białka w trakcie symulacji kompleksu ErmC'.

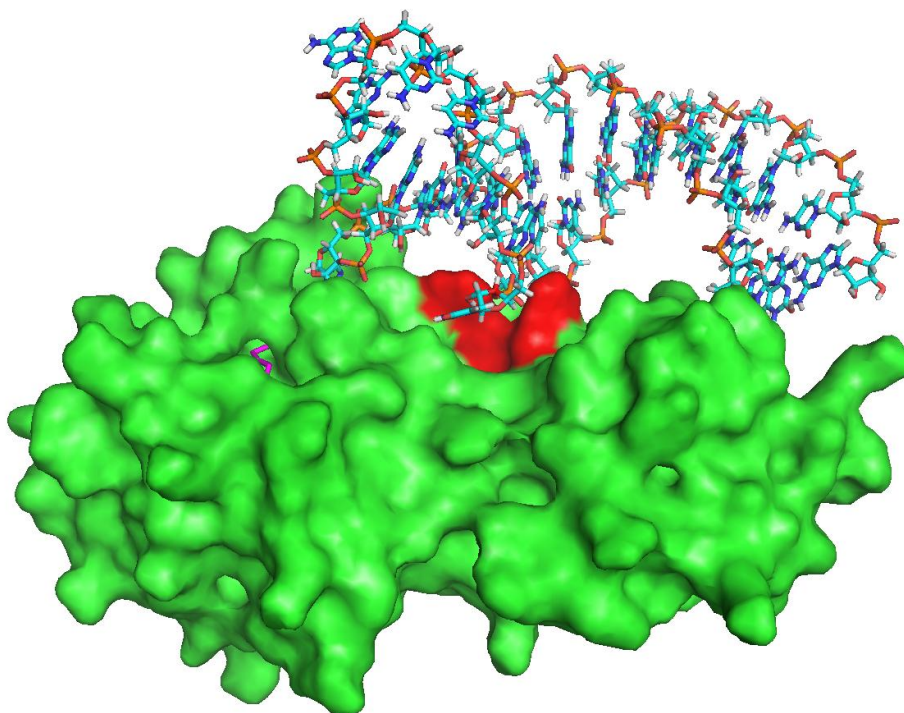
Jak widać na rycinie 34, w trakcie symulacji kompleksu doszło do oddalenia się substratu RNA od białka. RMSD w trakcie symulacji rosło nieprzerwanie i przekroczyło wartość 6Å (Ryc. 36). Inna perspektywa przedstawiona jest na Ryc.35, na której można zauważyć, że nie tylko minimalny substrat oddalił się od enzymu, ale także jego położenie względem ErmC' zmieniło się z prostopadłego na bliskie równoległe. Wskazuje to na istnienie słabych sił wiążących RNA do białka w startowej pozycji symulacji. Z tego powodu zakwestionowany został wstępnie zakładany model wzajemnego ułożenia się tych cząsteczek. Omawiana analiza białka pozwoliła wysnuć tezę dotyczącą rzeczywistej struktury trójwymiarowej tego kompleksu brzmiącą, że RNA powinno być położone równoległe do powierzchni ErmC'. Potwierdziły to rezultaty opisane poniżej.



Ryc. 36 RMSD kompleksu ErmC'-RNA podczas dynamiki molekularnej.

W toku dalszych badań udało się zadokować programem HADDOCK minimalny substrat otrzymany przy pomocy programu MCSym do ErmC'. Zasugerowane przez ten program wzajemne położenie tych cząsteczek odpowiada wnioskowi z poprzedniego akapitu. Widać np. że RNA jest ułożone w sposób równoległy do białka (Ryc. 37).

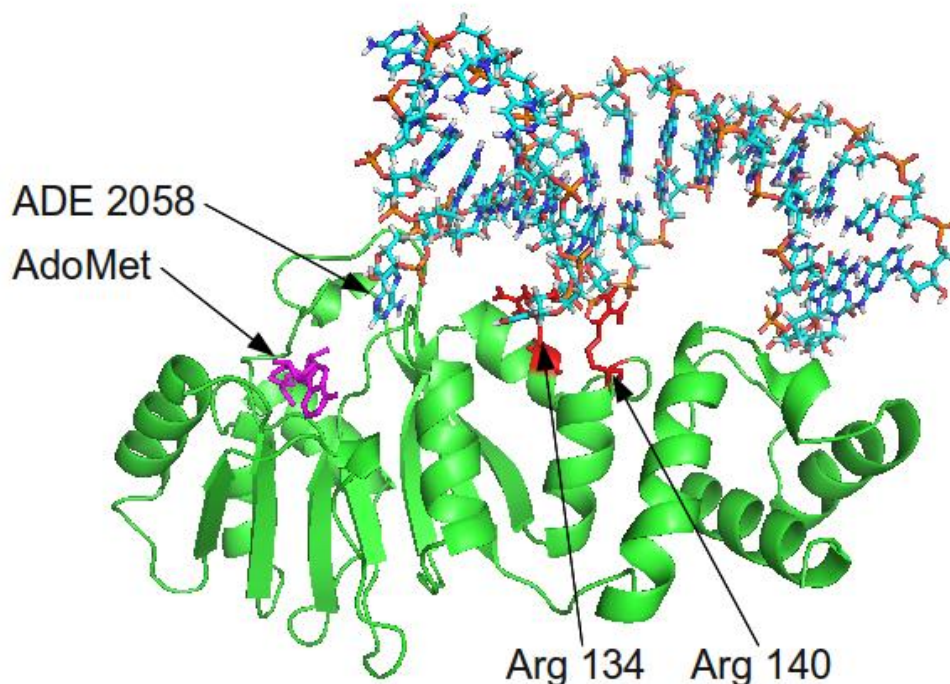
Oprócz związania modyfikowanej adenozyiny do kieszeni katalitycznej, istnieją jeszcze dwa miejsca interakcji między cząsteczkami RNA i ErmC'. Pierwszym z nich jest wybrzuszenie sąsiadujące z pętlą zawierającą modyfikowaną A2058 a oddziałujące z Arg134 i Arg140 z białka. Drugim – część helikalna substratu przylegająca do białka. Wszystkie te elementy stabilizują strukturę kompleksu. Wspomniane cząsteczki są widoczne na rycinie 37 będącej przedstawieniem końcowej konformacji kompleksu przewidzianej programem HADDOCK. Białko przedstawione jest na nim w reprezentacji powierzchniowej.



Ryc.37 Struktura końcowa kompleksu ErmC' (powierzchnia) z substratem RNA. Na czerwono zaznaczone zostały powierzchnie na białku odpowiadające Arg134 i Arg140.

Na Ryc.37 oprócz wspomnianej wcześniej równoległości położenia cząsteczek widać 3 miejsca interakcji białko-RNA. Zaznaczony na czerwono fragment w centrum białka stanowi idealne rusztowanie dla wybrzuszenia w środkowej części substratu. Miejscu temu odpowiadają Arg 134 oraz Arg 140 (Ryc. 38), których istotność dla wiązania RNA omawiana jest szerzej w części dotyczącej badania samego białka.

Powyższy model wspiera również wyniki mutacji przeprowadzonych przez prof. Bujnickiego [76], z których wynikało, że najistotniejszymi dla wiązania substratu resztami są Arg134 i Arg140. Substrat RNA w proponowanym modelu jest w interakcji z powyższymi resztami.



Ryc.38 Struktura końcowa kompleksu ErmC' (struktura 2D) z substratem RNA. AdoMet jest zaznaczony na fioletowo, natomiast reszty istotne dla wiązania substratu na czerwono.

Na Ryc.38 można zaobserwować, że modyfikowany nukleotyd zwrócony jest zasadą w stronę donora grupy metylowej, a łańcuchy boczne wspomnianych wyżej arginin stabilizują środkową część substratu na powierzchni białka.

#### 4.1.1.4. Poszukiwanie inhibitorów białka ErmC'

Jednym z kluczowych celów analizy białka ErmC' oraz wiązanej przez niego substratu RNA było znalezienie inhibitora, rozwiązującego problem bakteryjnej oporności na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>.

W tym celu wykonane zostało dokowanie cząsteczek z bazy Maybridge zarówno do kieszeni odpowiadającej za wiązanie modyfikowanej zasady A2058 w ErmC', jak i do przewidywanego miejsca wiązania RNA. Dokowania te zostały przeprowadzone we współpracy z Marcinem Federem z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej z Warszawy (*ang. IIMCB – International Institute of Molecular and Cell Biology*) i zaowocowały opublikowaniem ich rezultatu: ChemMedChem.: Feder M., Purta E., Kosciński L., Cubrilo S., Vlahovicek G., Bujnicki J.M., „Virtual Screening and Experimental Verification to Identify Potential Inhibitors of the ErmC Methyltransferase Responsible for

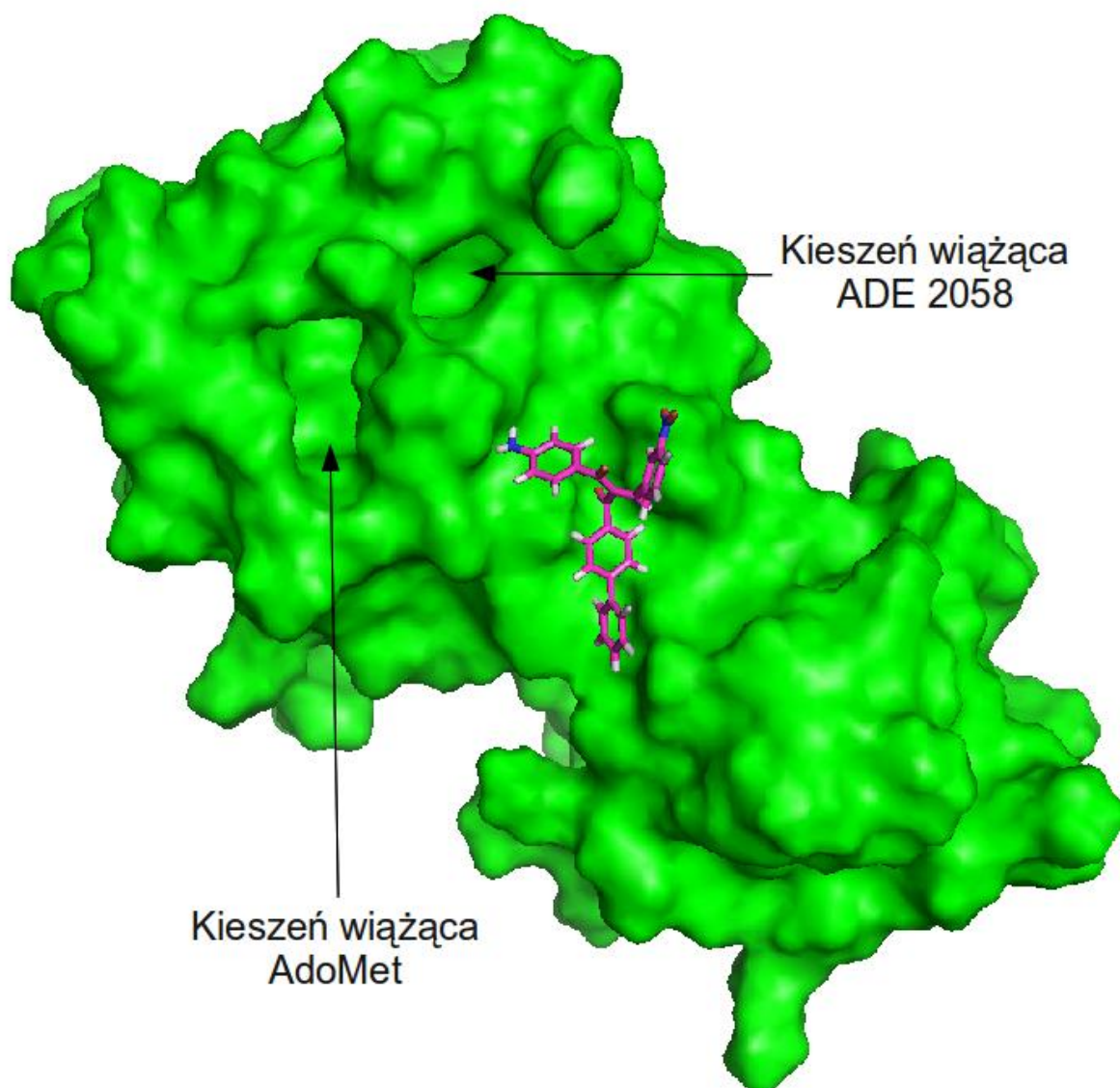
Bacterial Resistance against Macrolide Antibiotics”, *ChemMedChem*, 2008, 3: 316-322. Autor niniejszej pracy wykonał analizę potencjalnych inhibitorów metylotransferazy ErmC' wiążących się do miejsca wiązania RNA, natomiast Marcin Feder z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie – inhibitorów wiążących się do kieszeni wiążącej modyfikowaną adeninę 2058. W celu wygenerowania protomola w przypadku inhibitorów wiążących się w miejscu wiązania RNA zostały wykorzystane reszty: Thr108, Arg112, Arg134, Arg140, Ser141 oraz Leu142.

Po zadokowaniu potencjalnych inhibitorów do białka wybrane zostało po 20 najlepszych z obu analizowanych fragmentów białka – kieszeni na adeninę oraz miejsca wiązania RNA. Związki te przed wyborem do dalszych testów zostały ocenione funkcjami oceniającymi: D\_SCORE, G\_SCORE z programu CScore [150] oraz wewnętrzną funkcją oceniającą powinowactwo inhibitora do celu z programu Surflex. Inhibitory skierowane do dalszych testów wybrane zostały na podstawie konsensusu powyższych funkcji oceniających.

Następnie inhibitory te były testowane pod kątem efektywności inhibicji enzymu ErmC' w warunkach in vitro we współpracy z dr Gordaną Maravic z Wydziału Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Zagrzebiu. Do metylacji został wykorzystany syntetyczny oligonukleotyd (CGCGACGGACGGAAAGACCCCUAUCCGUCGCG). Inhibitory oznaczone symbolami: RF00667, PD00556, JFD03032, KM07948, RH01110 oraz BTB05276 wykazały aktywność IC<sub>50</sub> w zakresie 180-500 μM. Pięć z nich wiązało się do kieszeni na modyfikowaną adenozyne, natomiast ostatni, zaproponowany przez autora niniejszej pracy do miejsca wiązania substratu RNA.

Na Ryc.39 przedstawiony jest najlepszy inhibitor z przyłączających się do miejsca wiązania RNA (BRB05276), który został skierowany do badań in vivo. Pozostałe inhibitory przewidywane jako wiążące się do miejsca interakcji z RNA okazały się być nieaktywne in vitro. W badaniach in vitro BRB05276 okazał się bardzo obiecujący, zmniejszając MIC z 2560 w przypadku obecności samej erytromycyny, do 100 z inhibitorem. Jego całościowa ocena powinowactwa (*ang. affinity score*) wyniosła 5,24 podczas, gdy najlepiej oceniony rezultat z inhibitorów wiążących się do kieszeni na modyfikowaną adenozyne wyniósł 4,57. Większość badanych cząsteczek miała ocenę przekraczającą 6, co świadczy o niższej sile wiązania. Zbadane in vitro IC<sub>50</sub> jest równe 250μM co jest jednym z trzech najlepszych wyników dotyczących projektowanych w tym eksperymencie inhibitorów, gdyż w przypadku większości z nich mających wpływ na enzym, IC<sub>50</sub> wynosiło 500μM.

*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*



Ryc.39 Zaprojektowany inhibitor ErmC' na powierzchni białka.

Sukces eksperymentu dotyczącego zaprojektowanych inhibitorów oraz ich działania w warunkach *in vitro* potwierdza skuteczność tego rodzaju metod. Są one bardzo obiecującym sposobem projektowania nowych leków, co może pozwolić na znaczne obniżenie kosztów eksperymentów związanych z testowaniem związków, które nie okazałyby się efektywne eksperymentalnie. Wybrane najlepsze związki oraz ich dobre wyniki *in vitro* są dużym krokiem naprzód w blokowaniu ErmC'.

## **4.1.2 Metylotransferazy z rodziny RlmA**

Fragment niniejszej pracy doktorskiej dotyczący białek RlmA składa się z dwóch części. Pierwsza dotyczy białka RlmA(I) (dawniej nazywanego RrmA) modyfikującego G745 w 23S rRNA. Druga odnosi się do RlmA(II) (dawniej nazywanego TlrB), powodującego metylację G748 w 23S rRNA.

Białka RlmA(I) oraz RlmA(II) są homologiczne. Pierwsze z nich jest obecne w bakteriach Gram-ujemnych, natomiast drugie w Gram-dodatnich, co sugeruje, że mimo różnej specyficzności są najprawdopodobniej ortologami.

### ***4.1.2.1 Metylotransferaza RlmA(I) katalizująca metylację N1 G745***

Analizę białka RlmA(I) rozpoczęto się od pobrania struktury krystalograficznej (kod PDB: 1P91) z bazy RCSB [151].



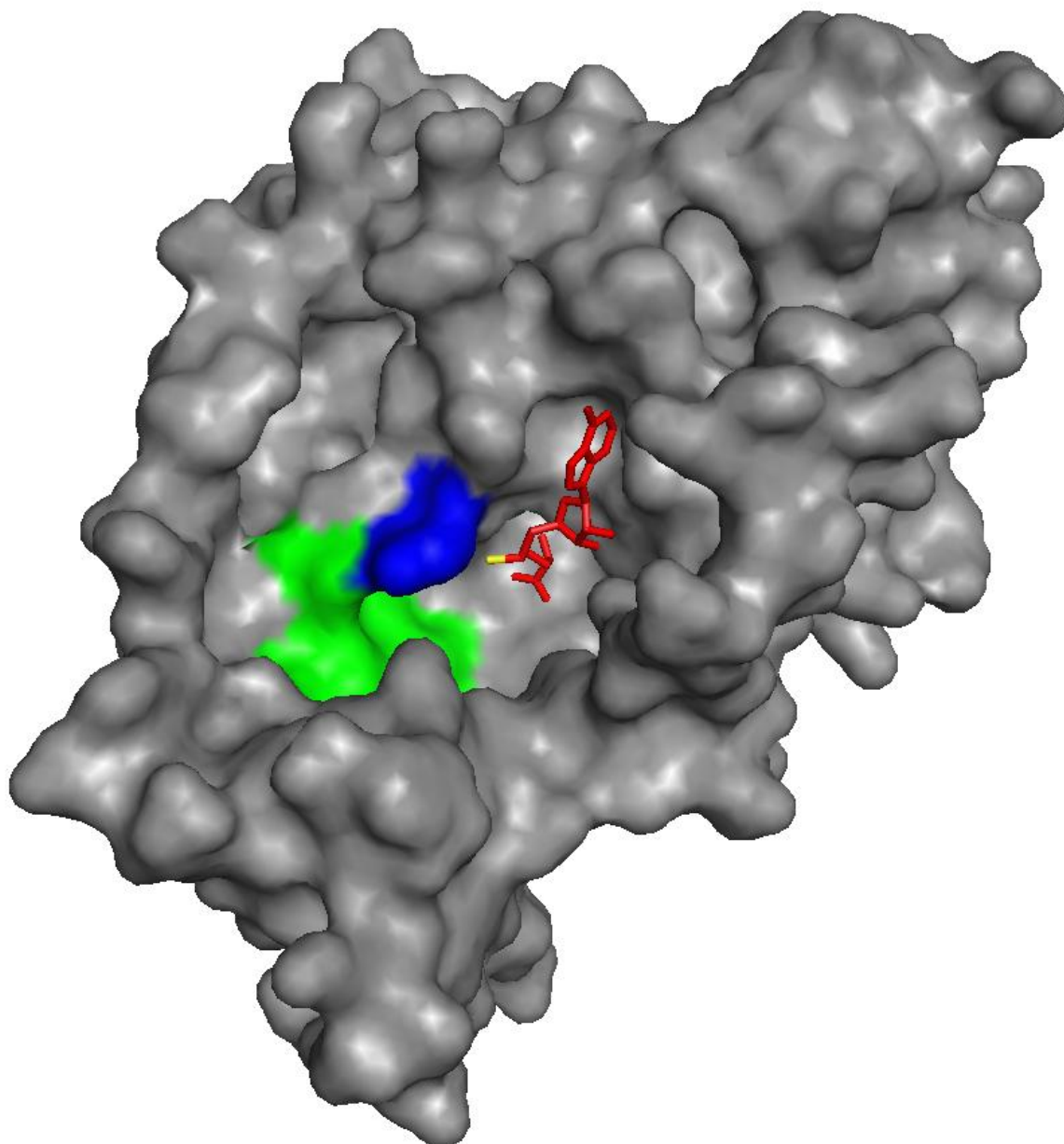
Ryc.40 Struktura przestrzenna białka RlmA(I). Długa pętla – czerwona.

Oprócz sztywnego i helikalnego rdzenia tego białka, w RlmA(I) jest wiele elementów mobilnych jak np. długa pętla występująca po jego lewej stronie (Ryc.40).

### ***Dokowanie AdoMet do RlmA(I)***

W dalszej części badań, do białka zadokowany został AdoMet. Wykorzystano przy tym program DOCK. Jako receptor do dokowania została wybrana głęboka kieszeń w środkowej części białka [85] zaznaczona na rycinie 41. Można tam również zauważyć, że w centralnej części białka RlmA(I) występuje dużej wielkości zagłębienie, mogące pełnić funkcję kieszeni katalitycznej na modyfikowaną guanozynę – G745. Grupa  $\text{CH}_3$

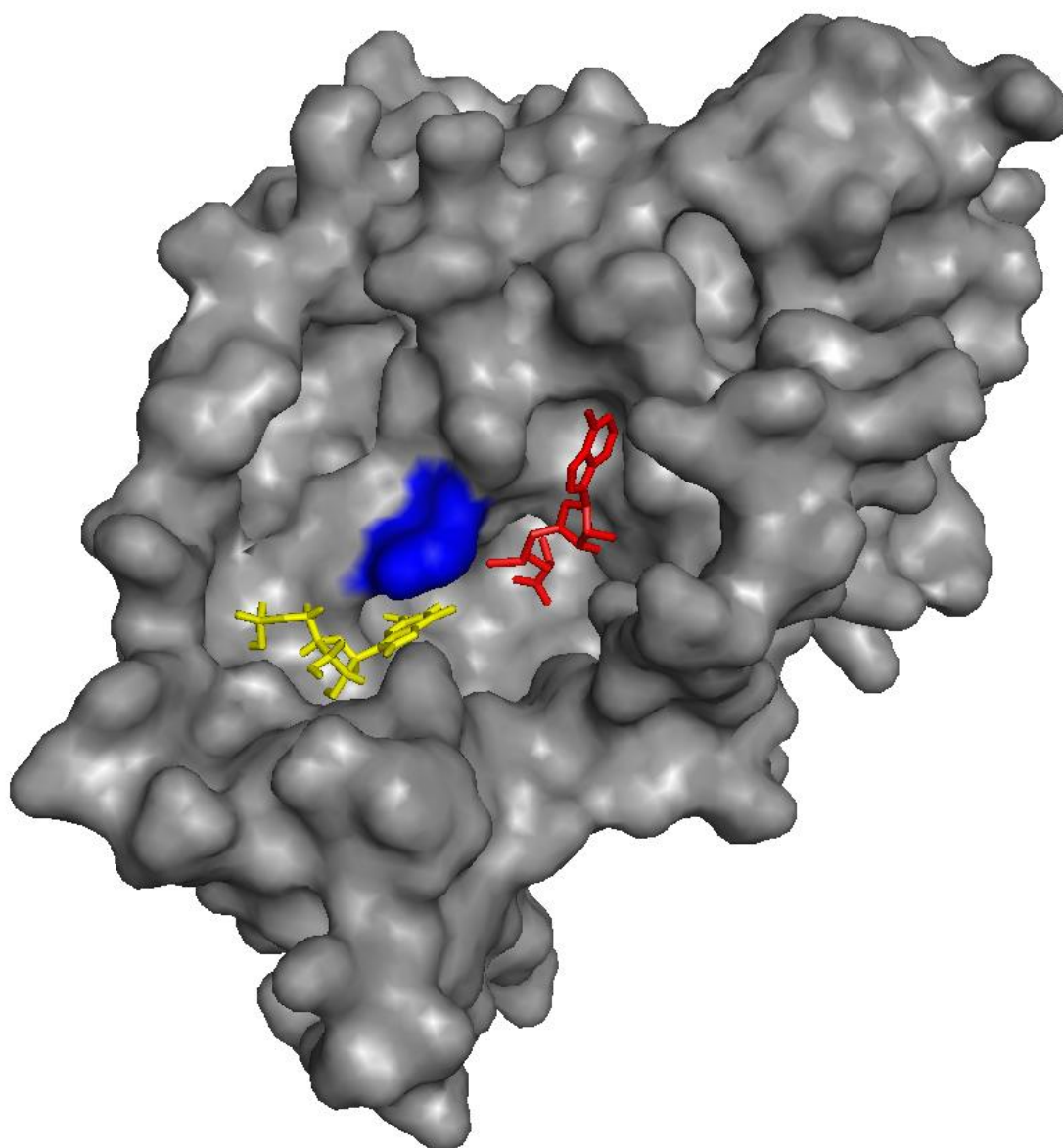
zadokowanego w niniejszej części pracy AdoMetu skierowana jest do zewnątrz, co jest wynikiem jak najbardziej poprawnym, gdyż konieczna jest dostępność tej grupy w procesie metylacji G745. Warto również wspomnieć, że ww. grupa metylowa znajduje się w sąsiedztwie Tyr156, zaangażowanej bezpośrednio w oddziaływanie z pierścieniem modyfikowanej guanozyny.



Ryc.41 Kofaktor na powierzchni białka RlmA(I). Na czerwono zaznaczony AdoMet, na żółto – atom węgla z grupy CH<sub>3</sub> w AdoMet – wystający w stronę kieszeni, na niebiesko – powierzchnia białka odpowiadająca Tyr156, na zielono głęboka kieszeń, potencjalnie na G745.

### ***Dokowanie modyfikowanego przez enzym nukleotydu***

Następnie, również z wykorzystaniem programu DOCK, wykonane zostało dokowanie modyfikowanego przez enzym RlmA(I) nukleotydu do modelu zawierającego białko oraz kofaktor. Ryc.42 przedstawia efekt tego dokowania. Na tle powierzchni białka zauważyć można z lewej strony modyfikowaną guanozynę oraz na prawo od niej donor grupy metylowej (AdoMet). Pierścień aromatyczny guanozyny jest położony równoległe do Tyr156, przewidywanej jako reszty oddziałującej z modyfikowanym nukleotydem, co potwierdza zasadność skonstruowanego modelu.

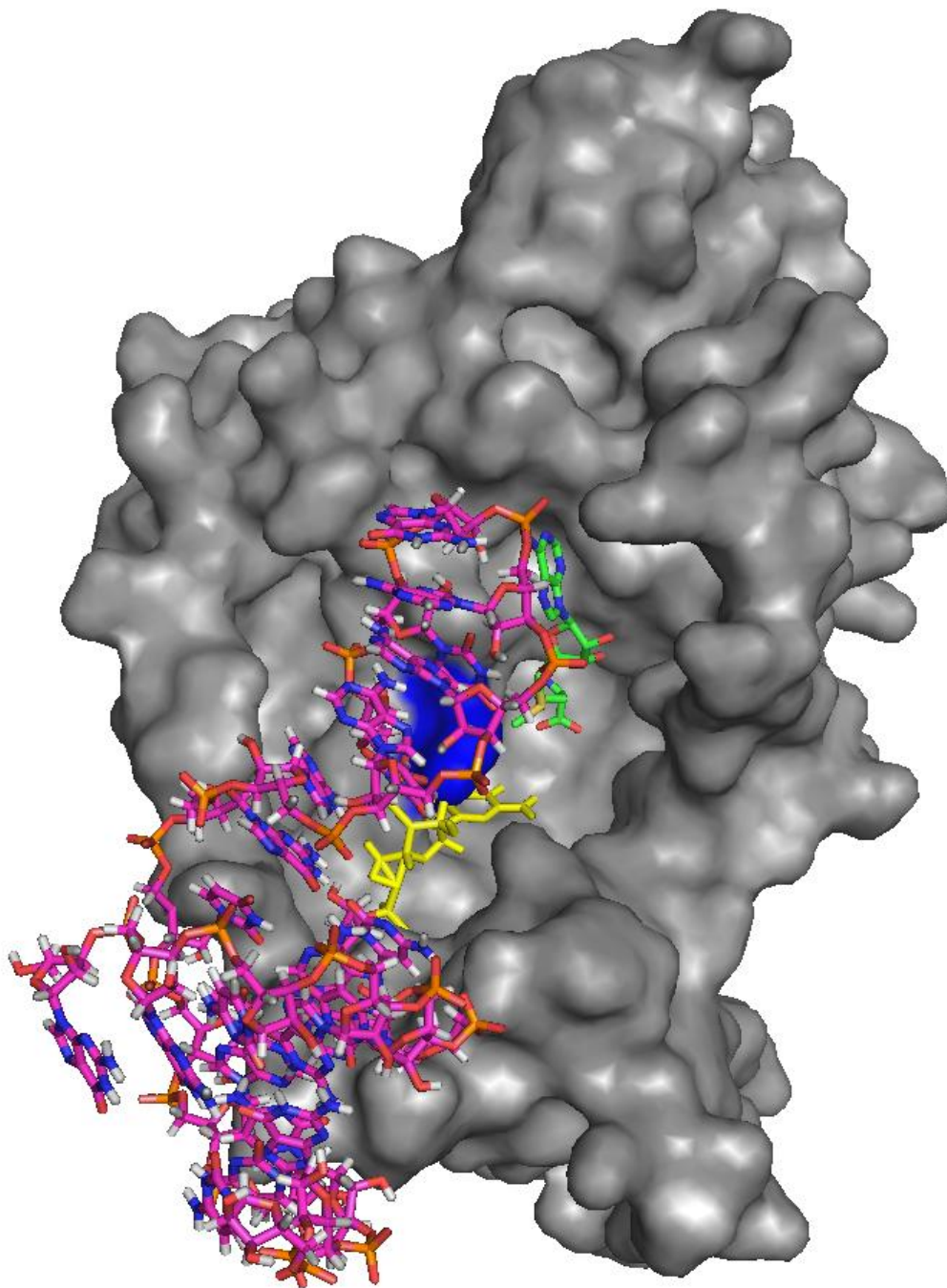


Ryc.42 G745 oraz AdoMet na powierzchni białka RlmA(I). AdoMet zaznaczono na czerwono, zadokowaną guanozynę na żółto, natomiast powierzchnię białka odpowiadającą Tyr156 na niebiesko.

### ***Dokowanie helisy 35 do RlmA(I)***

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, jakie będzie wzajemne umiejscowienie białka RlmA(I) i większego fragmentu RNA, tj. helisy 35 z rybosomu bakteryjnego *E. coli*, w celu stworzenia makromolekularnego modelu oddziaływań białko-RNA.

W tym celu wykorzystany został program HADDOCK – zapewniający dokładne wzajemne dokowanie białka oraz helisy RNA zawierającej modyfikowaną guanozynę.



Ryc.43 Helisa 35 z rybosomu *E. coli* zadokowana do powierzchni białka RlmA(I). AdoMet – zielony, G745 – żółta, Tyr156 – niebieska.

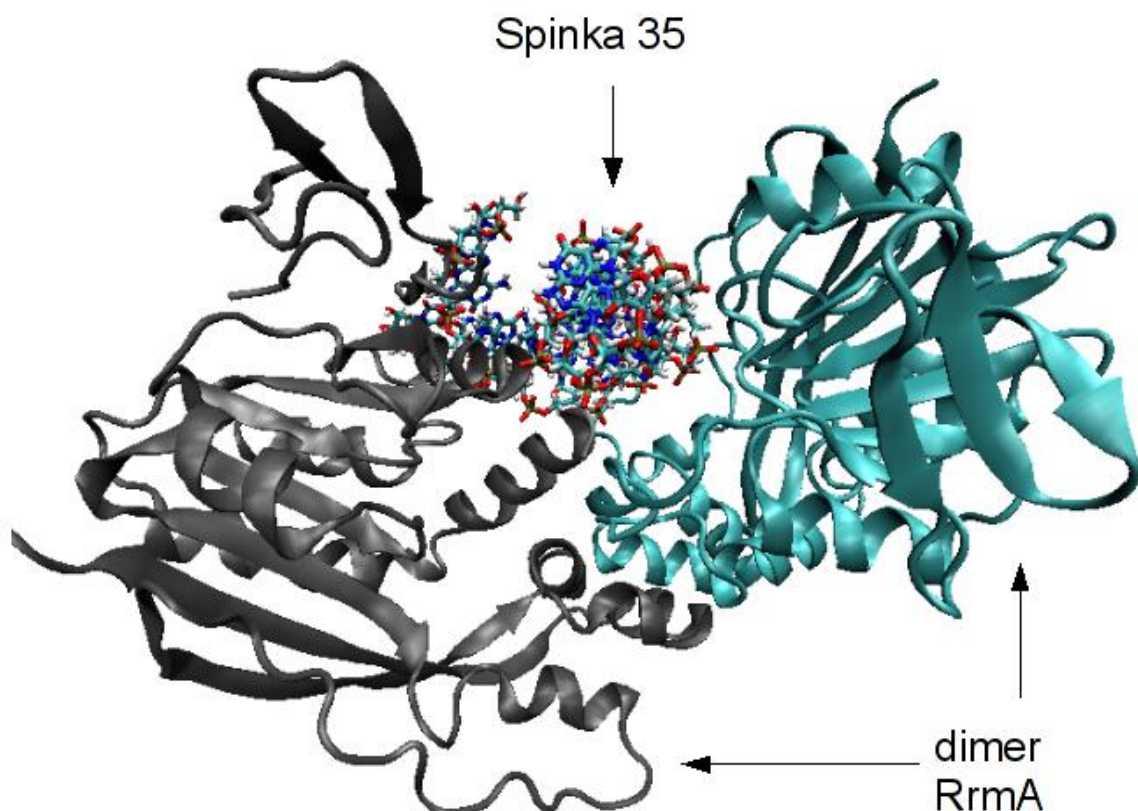
Jak widać na rycinie 43, model kompleksu uzyskany za pomocą programu HADDOCK jest zgodny z modelem otrzymanym dzięki wykorzystaniu aplikacji DOCK, umiejscawiającym G745 w sąsiedztwie Tyr156 w sposób umożliwiający oddziaływanie pierścieni aromatycznych.

W uzyskanym ułożeniu przestrzennym (Ryc.43) białko wykazuje wiele oddziaływań z RNA, co popiera tezę, że jest to stabilny model oddziaływań.

Jako że białko RlmA występuje w naturze w postaci dimerycznej, konieczne było zbadanie, czy umiejscowienie helisy RNA, uzyskane z dokowania programem HADDOCK, nie stoi na przeszkodzie wzajemnemu położeniu względem siebie monomerów w ramach kryształu białka RlmA (struktura PDB: 1P91).

Dokonano tego przez superpozycję istniejącej struktury dimerycznej ze strukturą monomeryczną, zawierającą zadokowaną spinę 35 RNA.

Efekt niniejszego nałożenia jest zilustrowany na Ryc.44.



Ryc.44 Helisa 35 powiązana ze strukturą dimeryczną białka RlmA(I).

Na Ryc.44 widać wyraźnie, że wskazane położenie zadokowanej helisy nie stoi na przeszkodzie we wzajemnym położeniu monomerów w ramach kryształu RlmA(I). Ponadto

model ten uwidacznia, iż wyraźna szczelina między monomerami zostaje dokładnie wypełniona przez helisę RNA, co zwiększa wiarygodność uzyskanej struktury.

#### **4.1.2.2 Metylotransferaza RlmA(II) katalizująca metylację N1 G748**

Następnym etapem prac było przeprowadzenie analogicznej analizy dla homologicznego białka RlmA(II).

#### **Budowa modelu białka RlmA(II)**

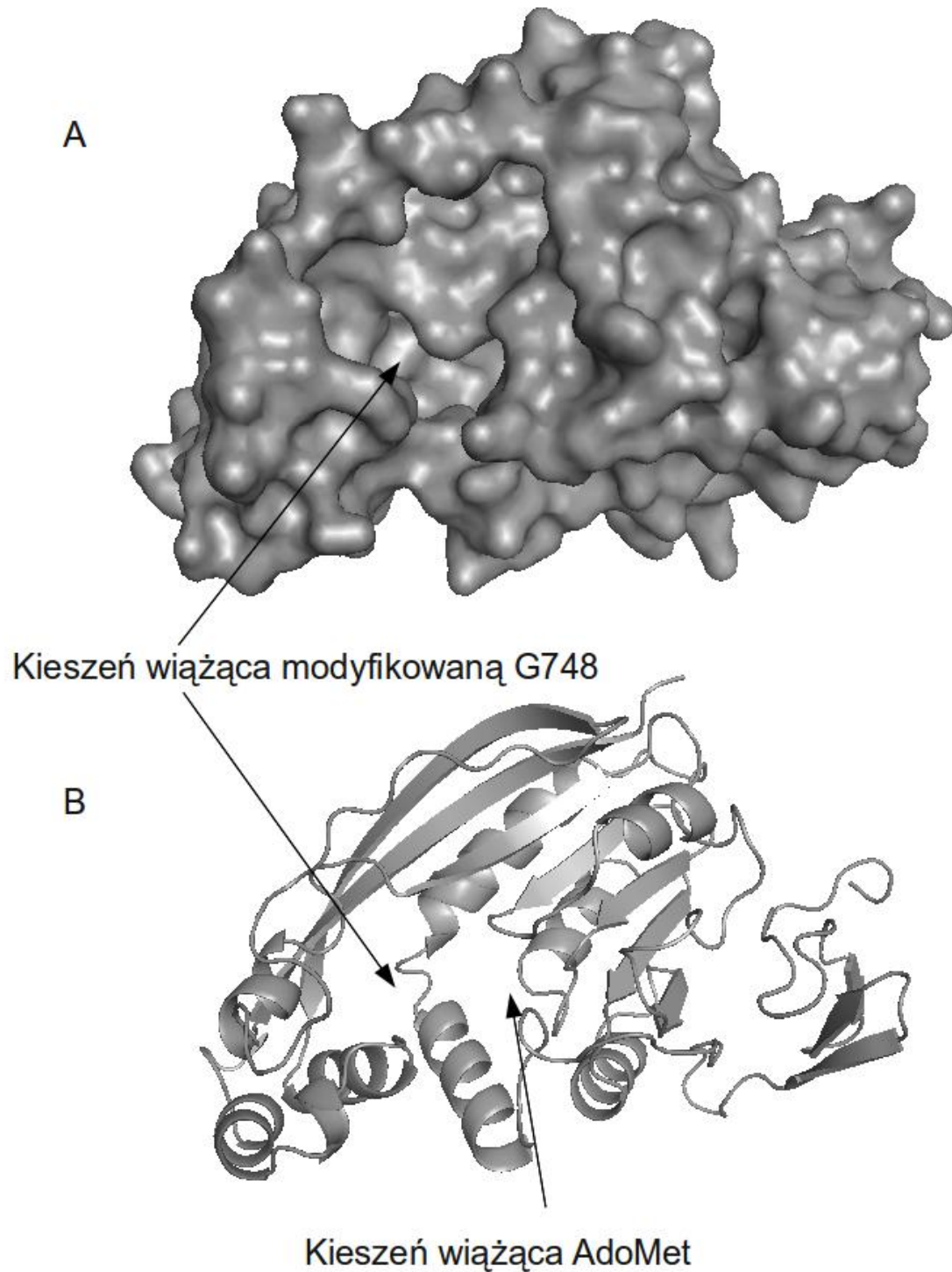
W przypadku tej cząsteczki, ze względu na brak współrzędnych doświadczalnych dotyczących RlmA(II), konieczne stało się w pierwszej kolejności stworzenie wiarygodnego modelu białka. W tym celu użyta została struktura krystalograficzna RlmA(I). Na Ryc.45 przedstawione jest przyrównanie białek RlmA(II) do RlmA(I).

RlmA (II)	1	MRKNVVRYLR	CPHCAAPLRS	SDRTLRCENG	HTFDVARQGY	VNLLRRP-TK
RlmA (I)	1	SFS	CPLCHQPLSR	EKNSYICPQR	HQFDMAKEGY	VNLLPVQHKR
		.	** * **	.	* ** . * . **	****
RlmA (II)	50	LA--ADTTDM	VAARAALLDS	GHYAPLTERL	AGTARRAAGA	GAPDCVVDIG
RlmA (I)	44	SRDPGDSAEM	MQARRAFLDA	GHYQPLRDAI	VAQLRERLD-	DKATAVLDIG
		. * . . . *	. ** * . ** .	*** ** . .	. *	. * . ** *
RlmA (II)	98	GGTGHHLARV	LEEFEDAEGE	LLDMSKPAVR	RAARAHPRAS	SAVADVWDTL
RlmA (I)	93	CGEGYYTHAF	ADALPEITTF	GLDVSKVAIK	AAAKR-YPQV	TFCVASSHRL
		* *	. . . .	** . ** * . .	** .	. *
RlmA (II)	148	PLRDGAAAMA	LNVFAPRNPP	EIRRILRPGG	TLLVVTPQQD	HLAELV-DAL
RlmA (I)	142	PFSDTSMDAI	IRIYAPCKAE	ELARVVKPGG	WVITATPGPR	HMELKGLIY
		* . * .	. . . ** . .	* . * . . . ** *	. . **	** **
RlmA (II)	197	GLLRVRDHKE	GRLAEQLAPH	FEAVGQ-ERL	RTTLRLDHDA	LGRVVAMGPS
RlmA (I)	192	NEV--HLHAP	HAE---QLEG	F'TLQQSAELC	YPMRLRG-DE	AVALLQMTPF
		. . *	.	* *	. *	. . * *
RlmA (II)	246	SWHQDPDELA	RRIAELPGIH	EVTLSVTFTV	CRPLP	
RlmA (I)	236	AWRAK-PEVW	QTLAAKE-VF	DCQTFDFNIHL	WQRSY	
		. * . *	. . *	. .	. . .	

Ryc.45 Przyrównanie sekwencyjne RlmA(II) i RlmA(I) ze wskazaniem podobnych (.) i identycznych reszt aminokwasowych (\*).

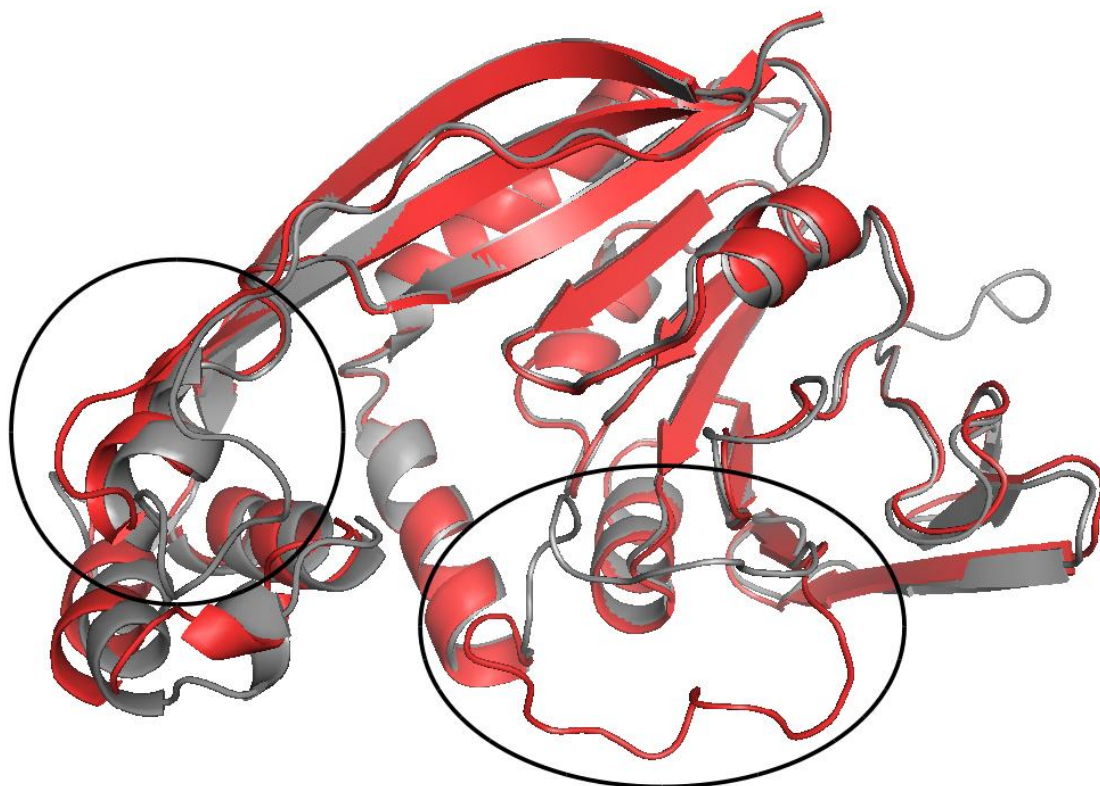
*Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.*

Dzięki metodzie modelowania homologicznego uzyskany został model białka RlmA(II) przedstawiony na Ryc.46.



Ryc.46 Białko RlmA(II) – model powierzchni (A) oraz struktury trzeciorzędowej (B).

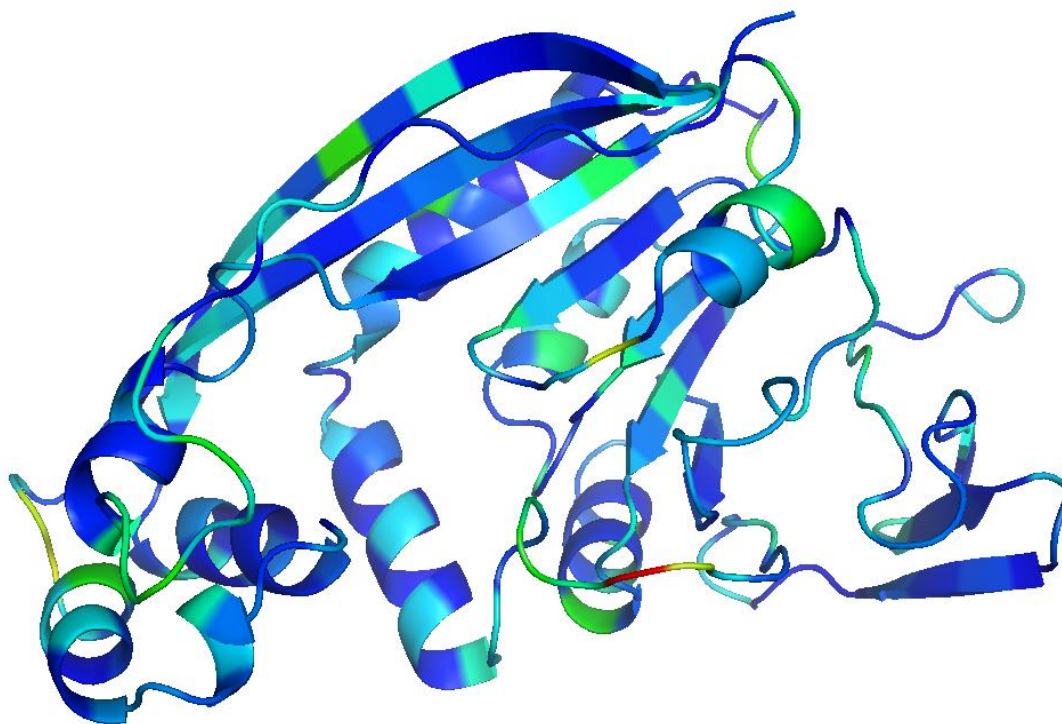
Między RlmA(I) oraz RlmA(II) widać bardzo wyraźne podobieństwo strukturalne, co jest zobrazowane na Ryc.47.



Ryc.47 Nałożone struktury białek RlmA(I) (czerwone) oraz RlmA(II) (szare). Pętle różniące białka zostały otoczone okręgiem (pętla lewa) oraz elipsą (pętla dolna).

Jak widać z Ryc.47, środek struktury budujący te białka pozostaje niezmienny. Różnice są zauważalne w dwóch pętlach. Pierwsza występuje przy resztach 36-50 w RlmA(I) (36-54 w RlmA(II)) i została zaznaczona elipsą na Ryc.47. Jest ona widoczna w dolnej części powyższej ryciny. W białku RlmA(I) łańcuch główny jest bardziej wyeksponowany niż w skierowanej do wnętrza białka pętli w RlmA(II). Druga pętla położona jest w rejonie 190-196 w RlmA(I) (196-206 w TrmB) i zaznaczona okręgiem po lewej stronie na rycinie 47, ukazując, że pętla w RlmA(II) skierowana jest w stronę kieszeni na substrat.

Model białka RlmA(II) poddano ocenie metodą MetaMQAPII uzyskując wysoką ocenę GDT\_TS=66,8.



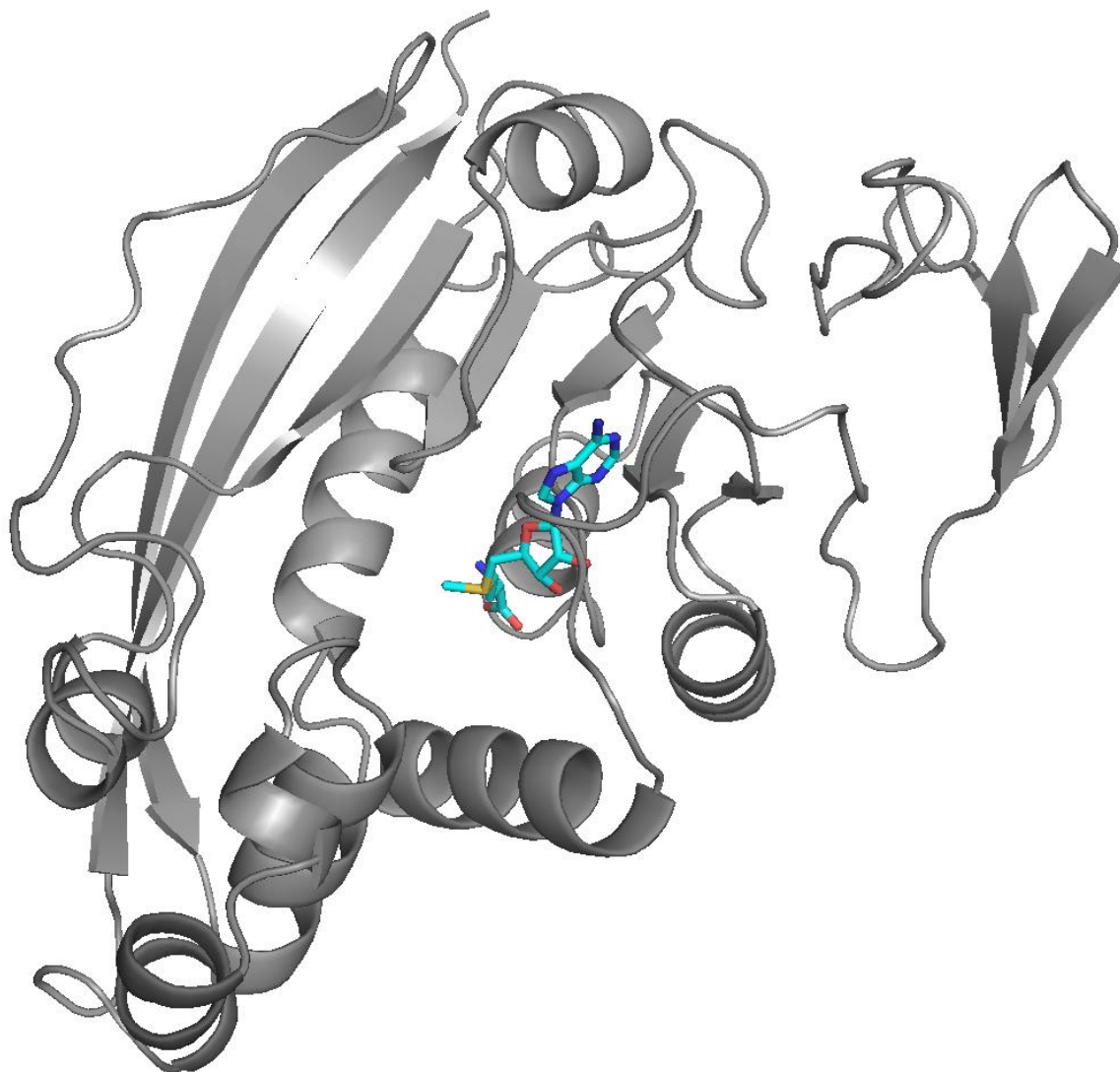
Ryc.48 Białko pokolorowane po wartości oceny z MetaMQAP – niebieski – bardzo dobry fragment modelu, czerwony – słaby.

Model białka RlmA(II) został oceniony przez program MetaMQAPII bardzo wysoko (Ryc.48), wskazując zaledwie kilka reszt aminokwasowych w całej strukturze, które nie są uznane za poprawnie przewidziane – kolor czerwony.

Uzyskanie powyższego modelu dało możliwość na zadokowanie donora grupy metylowej do modelu białka RlmA(II).

### ***Dokowanie AdoMet do RlmA(II)***

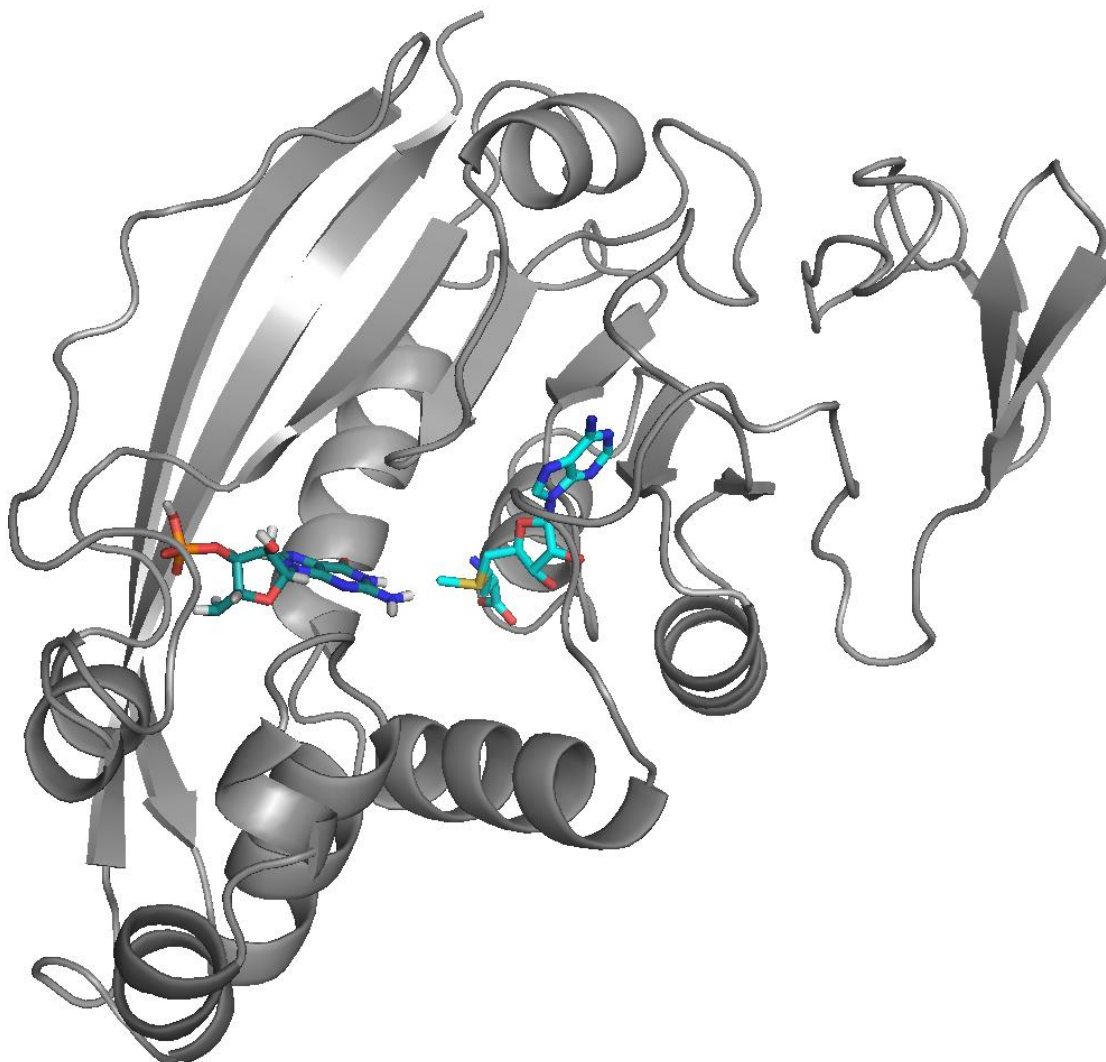
Analogicznie do analizy przeprowadzanej w projekcie RlmA(I) – AdoMet został zadokowany aplikacją DOCK do modelu RlmA(II). Miejsce wiązania kofaktora zostało wybrane do konserwowanej kieszeni w RlmA(II) bliźniaczej do obserwowanej w RlmA(I). Rezultat przedstawia Ryc.49.



Ryc.49 AdoMet zadokowany do RlmA(II).

### ***Dokowanie G748 do RlmA(II)***

W toku dalszej analizy do kompleksu RlmA(II)-AdoMet została zadokowana guanozyna G748 modyfikowana przez ten enzym. Rezultat tego dokowania widać na Ryc.50.

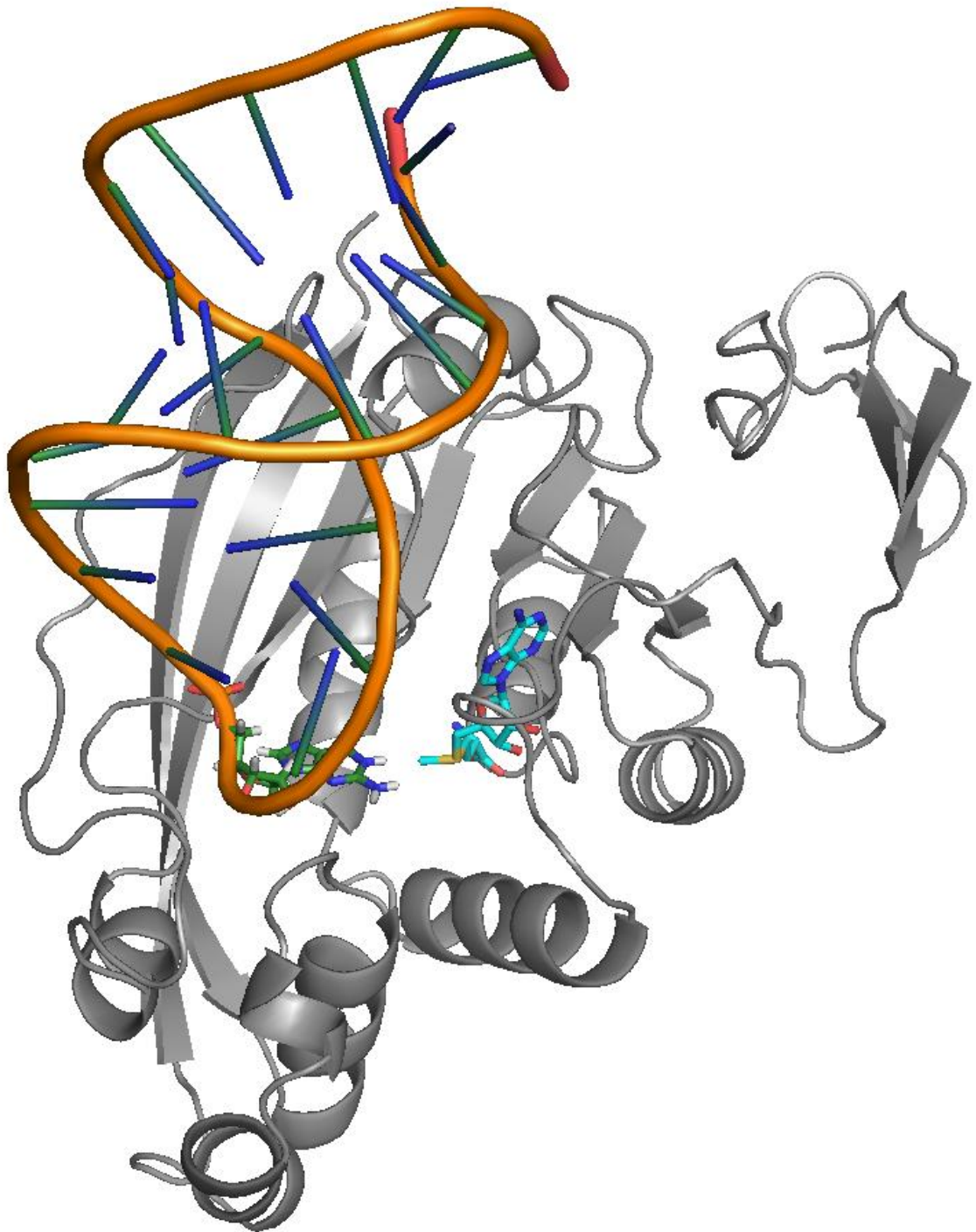


Ryc.50 Zadokowana G748 do białka RlmA(II) z AdoMet. Po lewej – modyfikowana guanozyna (kolor zielony), po prawej – AdoMet (niebieski).

### ***Dokowanie helisy 35 rRNA do RlmA(II)***

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie, jak układa się cały substrat RNA w stosunku do białka RlmA(II). Dokowanie helisy 35 rRNA zostało wykonane aplikacją HADDOCK, a jego rezultat (najwyżej oceniony wynik z najlepszego klastra) jest zobrazowany na Ryc.51.

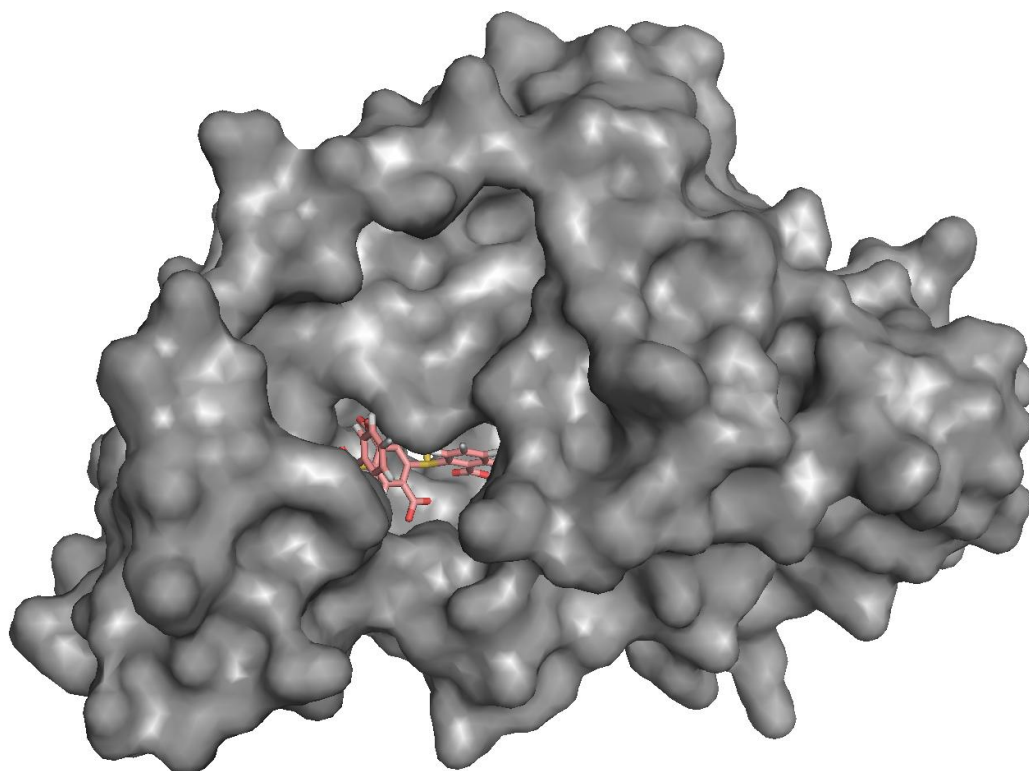
Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.



Ryc.51 Helisa 35 z rybosomalnego RNA *E. coli* zadokowana do białka RlmA(II). AdoMet jest zaznaczony na niebiesko, podczas gdy modyfikowana guanozyna jest w kolorze zielonym.

### ***Poszukiwanie inhibitorów metylotransferazy RlmA(II)***

Ostatnim etapem projektu związanego z RlmA było zaproponowanie potencjalnych inhibitorów niskocząsteczkowych. Praca ta została wykonana z wykorzystaniem programu DOCK. Jako receptor na potencjalny inhibitor została wybrana cała kieszeń w białku stanowiąca miejsce wiązania kofaktora oraz modyfikowanej guanozyny. Wykonane zostało dokowanie elastyczne, wykorzystując jako źródło ligandów bazę cząsteczek Maybridge. Końcowy rezultat – inhibitor RlmA(II) przedstawiony na Ryc.52.



Ryc.52 Zaprojektowany inhibitor enzymu RlmA(II).

Zaprojektowany inhibitor metylotransferazy RlmA(II) zajmuje zarówno przestrzeń, w której dokuje się donor grupy metylowej, jak i miejsce modyfikowanej guanozyny, przez co tym skuteczniej powinien hamować działanie enzymu RlmA(II). Ocena Grid Score (funkcja oceniająca programu DOCK) tego wyniku wyniosła -91. W porównaniu z pozostałymi rezultatami, których ocena wynosiła ok. -60 jest to bardzo dobry wynik. Ponadto warto zaznaczyć, że istniało kilka rezultatów o ocenach nieco wyższych od przytoczonego, jednakże wspomniane cząsteczki wiązały się tylko do kieszeni wiążącej AdoMet. W związku z tym, jako, że założeniem niniejszego wirtualnego badania

przesiewowego było wytypowanie inhibitora blokującego zarówno miejsce wiązania kofaktora jak i modyfikowanego nukleotydu, wybrany został rezultat przedstawiony powyżej.

## **4.2. Metylotransferazy przeprowadzające modyfikację m1A w 16S rRNA**

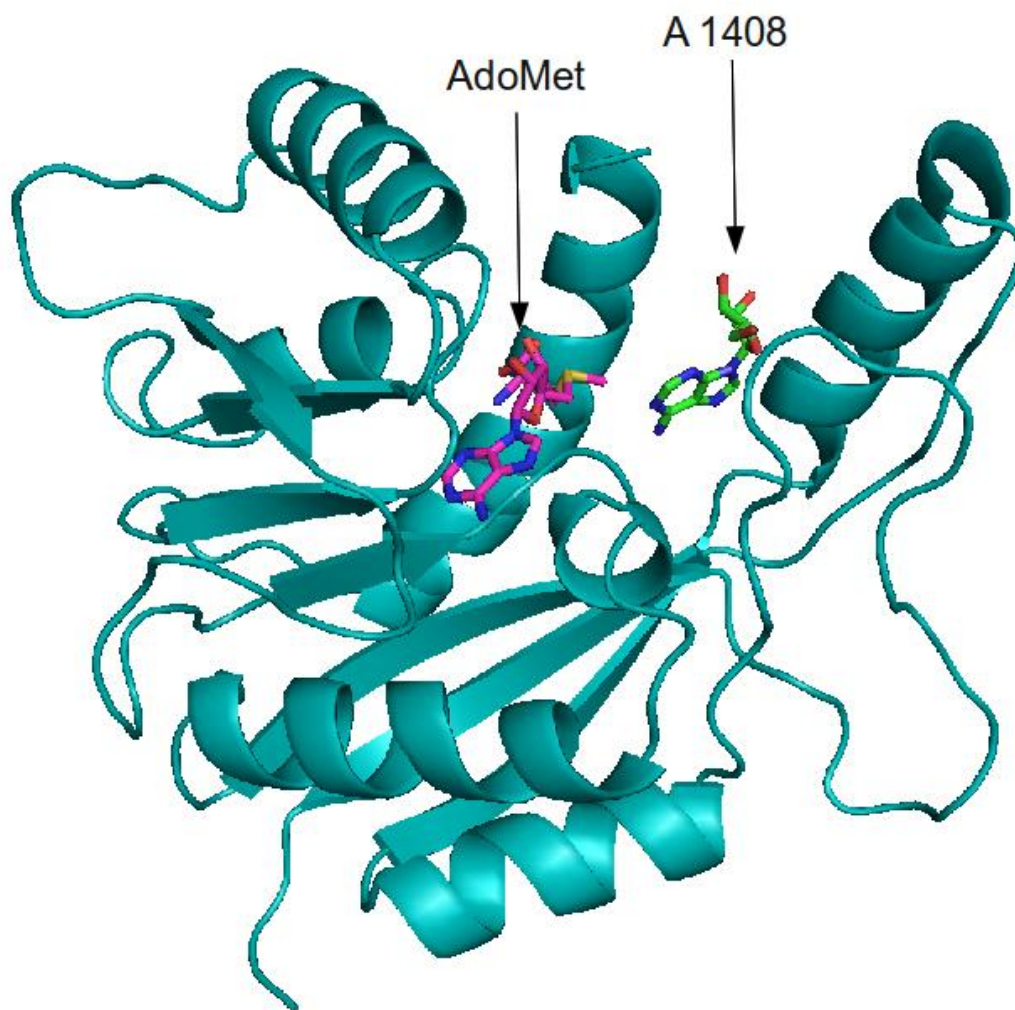
### **4.2.1 Metylotransferaza KamB modyfikująca N1 w A1408**

Celem tego etapu pracy była początkowo analiza sekwencji rodziny enzymów Kam, a także stworzenie modelu strukturalnego obrazującego oddziaływanie między białkiem KamB a donorem grupy metylowej (AdoMet) i nukleotydem modyfikowanym przez ten enzym (A 1408). Po zbudowaniu modelu rozwiązana została niezależnie struktura krystaliczna, co umożliwiło weryfikację modelu oraz poszukiwanie potencjalnych inhibitorów enzymu.

Poszukiwanie podobieństwa sekwencji z wykorzystaniem programu PSI-BLAST nie wykazało podobieństwa sekwencyjnego innych białek spoza rodziny Kam. Przewidywanie struktury zostało przeprowadzone za pomocą metody przewidywania zwoju (*ang. Fold Recognition – FR*) z użyciem metaserwera GeneSilico [152]

W przyrównaniu sekwencyjnym białka ShKam z innymi białkami z rodziny Kam dało się jednak zaobserwować, iż w ShKam brakuje jednej z najważniejszych części cząsteczki, tzn. miejsca wiązania donora grupy metylowej – AdoMet. Fragment ten jest konserwowany we wszystkich metylotransferazach typu RFM (*ang. Rossman Fold MTase*). Obserwacja ta skłoniła do przypuszczenia, że sekwencja ShKam jest niekompletna, a bez wspomnianego fragmentu wiążącego AdoMet struktura ShKam nie mogłaby się poprawnie utworzyć. Sekwencje członków rodziny Kam nie były do chwili przeprowadzania tej analizy sprawdzane doświadczalnie. Aby zatem zweryfikować powyższe podejrzenie przeprowadzono porównanie sekwencji DNA genów Kam, co ujawniło istnienie konserwowanego regionu kodującego potencjalny brakujący koniec N białka ShKam (60 reszt). Analiza zaktualizowanej sekwencji aminokwasowej ShKam pokazała, że motywy konieczne do wiązania AdoMet są obecne w tym „dodatkowym” fragmencie.

Model interakcji białko-kofaktor został zaproponowany przez prof. Janusza Bujnickiego. Współrzędne motywu wiążącego AdoMet zostały skopiowane z białka Ycgj (kod PDB: 1GLU). Równoległe przez autora niniejszej pracy, przy użyciu programu DOCK został stworzony model wiązania do kieszeni katalitycznej ShKamB modyfikowanego nukleotydu A1408. Spośród wyników, w których atom N1 adenozyiny znajdował się w odległości poniżej 3,5 Å od AdoMet, wybrana została struktura o najniższej energii (Ryc. 53).



Ryc.53 Model oddziaływań białko KamB – AdoMet – ADE 1408.

Na Ryc.53 ukazany jest teoretyczny model ShKam ze związanym AdoMet oraz modyfikowaną adenozyną 1408. Powyższe wyniki zostały opublikowane w pracy: Koscinski L., Feder M., Bujnicki J.M., „Identification of a Missing Sequence and Functionally Important Residues of 16S rRNA:m1A1408 Methyltransferase KamB that Causes Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics”, *Cell Cycle*, 2007, 6:10.

## 4.2.2 Metylotransferaza NpmA modyfikująca N1 w A1408

### 4.2.2.1 Analiza sekwencji i struktury enzymu NpmA

Po opublikowaniu naszego przewidywania brakującego fragmentu sekwencji i struktury KamB odkryto kolejnych członków rodziny, których sekwencje potwierdziły naszą hipotezę. Jednym z nowoodkrytych enzymów była przenoszona na plazmidzie przez transfer horyzontalny, a wykryta w *Escherichia coli*, metylotransferaza NpmA. Powoduje ona silną oporność na antybiotyki z aminoglikozydów jak np. na neomycynę, kanamycynę, czy apramycynę. Współpracująca z nami grupa dr J. Sivaramana z Narodowego Instytutu w Singapurze rozwiązała strukturę krystaliczną tego białka – wyniki ukazały się w pracy współautoryzowanej przez naszą grupę (Husain N., Obranich S., Koscinski L., Seetharaman J., Babic F., Bujnicki J.M., Maravic-Vlahovicek G. and Sivaraman J., "Structural basis for the methylation of A1408 in 16S rRNA by a panaminoglycoside resistance methyltransferase NpmA from a clinical isolate and analysis of the NpmA interactions with the 30S ribosomal subunit", *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(5): 1903-1918.).

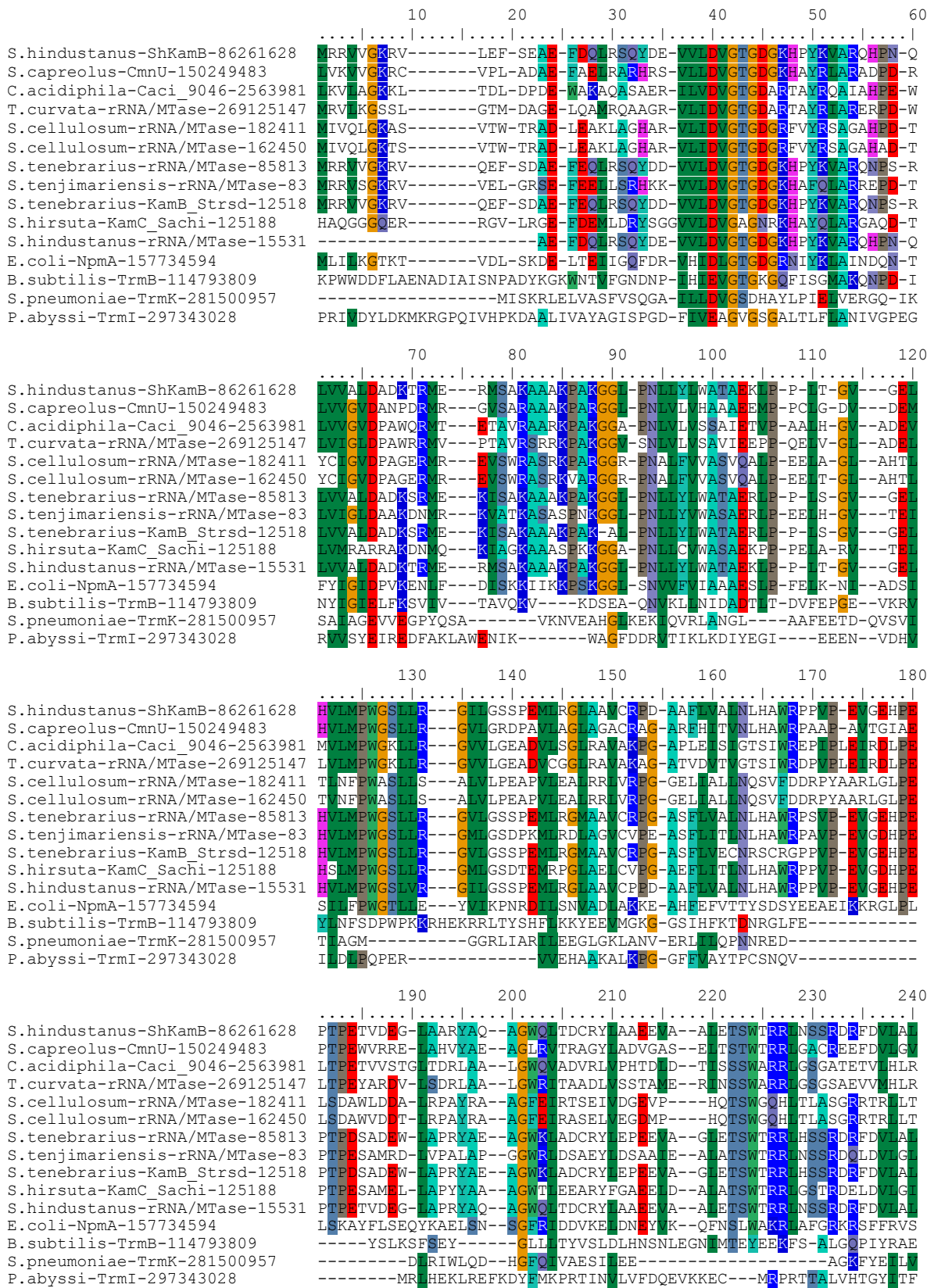
W celu identyfikacji sekwencji homologicznych do NpmA wykonano przeszukiwanie nieredundantnej bazy białek (*ang. non-redundant database*) programem PSI-BLAST. Ponadto wykonane zostało przeszukanie bazy danych znanych struktur, z użyciem programu DALI [153]. Wyniki zebrane w Tab.2 wykazały, że najbliższym homologiem rodziny MTaz Kam są MTazy TrmB/Trm8 przeprowadzające metylację m<sup>7</sup>G w tRNA, a nie inne MTazy m<sup>1</sup>A, np. TrmI i TrmK.

Tab.2 Struktury białek podobnych do NpmA zidentyfikowane za pomocą serwera DALI.

DALI nr	PDB id	Z - score	RMSD [Å]	podob. amin.	ident. [%]	organizm	białko
1	2fca	16,1	2,8	205	17	<i>Bacillus subtilis</i>	TrmB
2	1yzh	15,2	2,9	206	17	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	metylotransferaza modyfikująca N7 w guanozynie w tRNA
3	3dxx	14,3	3,2	208	16	<i>Escherichia coli</i>	metylotransferaza modyfikująca N7 w guanozynie w tRNA
4	3ckk	13,5	3	197	16	<i>Homo sapiens</i>	metylotransferaza modyfikująca N7 w guanozynie w tRNA
5	3mgg	13,3	3,3	253	22	<i>Methanosarcina mazei</i>	metylotransferaza
6	2vdv	13,2	2,8	217	16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Trm8
7	1xxl	13	2,8	234	22	<i>Bacillus subtilis</i>	YcgJ
8	1vl5	12,8	3,1	231	15	<i>Bacillus halodurans</i>	konserwowane białko BH2331 o nieznanym funkcji
9	2ipx	12,8	2,6	220	15	<i>Homo sapiens</i>	Fibrilaryna-metylotransferaza rRNA
10	1qzz	12,7	3,2	340	12	<i>Streptomyces purpurascens</i>	Hydrolaza aklacynomycyny

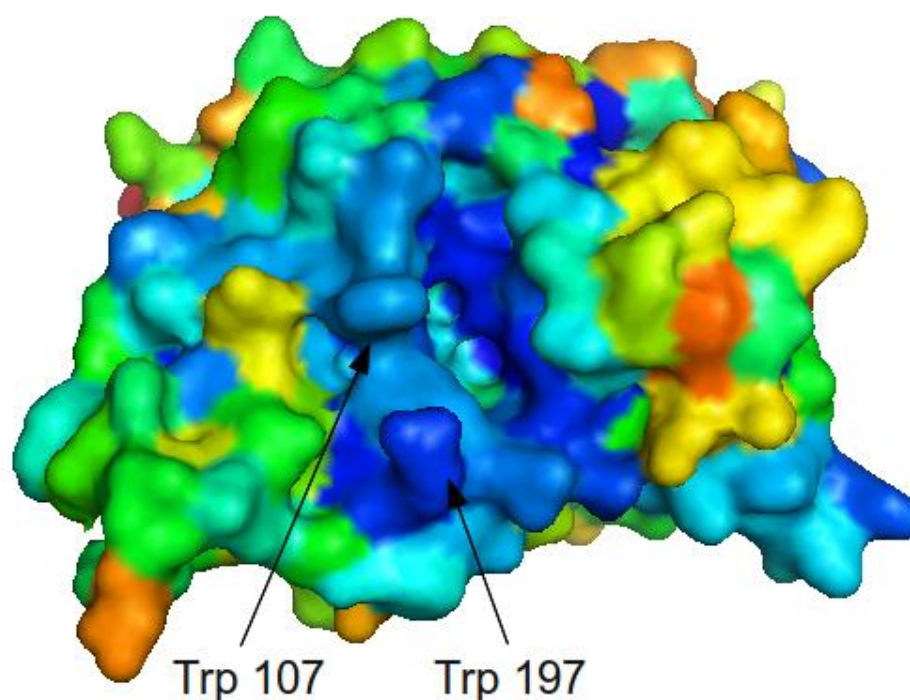
Stworzone zostało przyrównanie sekwencji białek Kam z uwzględnieniem wyników PSI-BLAST i DALI (dodane białka: TrmB, TrmI i TrmK) (Ryc.54). Z przyrównania sekwencyjnego widać, że reszty aminokwasowe obecne w motywach I (37-62) oraz II (61-66) odpowiedzialne za wiązanie kofaktora są konserwowane wśród wszystkich enzymów Kam, jak również u TrmB, TrmI i TrmK. Z kolei pozostałe motywy m.in. odpowiadające za wiązanie substratu różnią się znacząco, zwłaszcza między MTazami m<sup>1</sup>A z różnych rodzin (Kam, TrmK i TrmI), co sugeruje, że realizują one wiązanie tego samego substratu na różne sposoby.

**Bioinformatyczna analiza struktury i oddziaływań z substratami metylotransferaz RNA odpowiedzialnych za oporność bakterii na antybiotyki.**



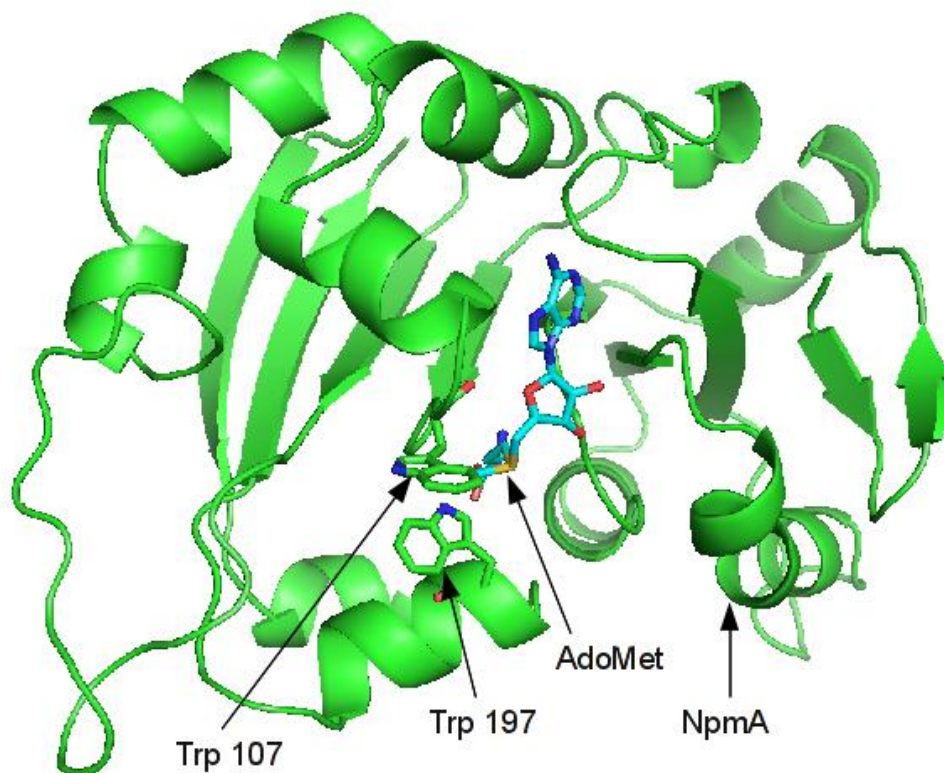
Ryc.54 Przyrównanie sekwencyjne rodziny Kam.

W oparciu o przyrównanie sekwencji białek z rodziny Kam zmapowano konserwację sekwencji na strukturę białka NpmA programem CONSURF [154] (Ryc. 55). Dzięki temu wynikowi można zaobserwować, które rejony w białku podlegają największej presji selekcyjnej i zapewne są najistotniejsze dla jego funkcji.



Ryc.55 Zmapowana konserwacja sekwencyjna rodziny Kam na strukturę NpmA. Kolor niebieski znaczy wysoką konserwację a czerwono-pomarańczowy – niską.

Z Ryc.55 wyraźnie widać, że mocno konserwowany jest centralny rejon białka odpowiadający kieszeni wiążącej donor grupy metylowej (kolor niebieski). Zaobserwować można także silną konserwację dwóch reszt aminokwasowych na lewo od kieszeni. Są to dwie reszty tryptofanu, Trp107 oraz Trp197 (Ryc 56). Badania przeprowadzone przez naszych współpracowników (zespół dr Gordany Maravic z Wydziału Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Zagrzebiu) wskazują na to, że substytucje aminokwasowe Trp107Ala oraz Trp197Ala powodują spadek aktywności enzymu do 15% w stosunku do typu dzikiego.

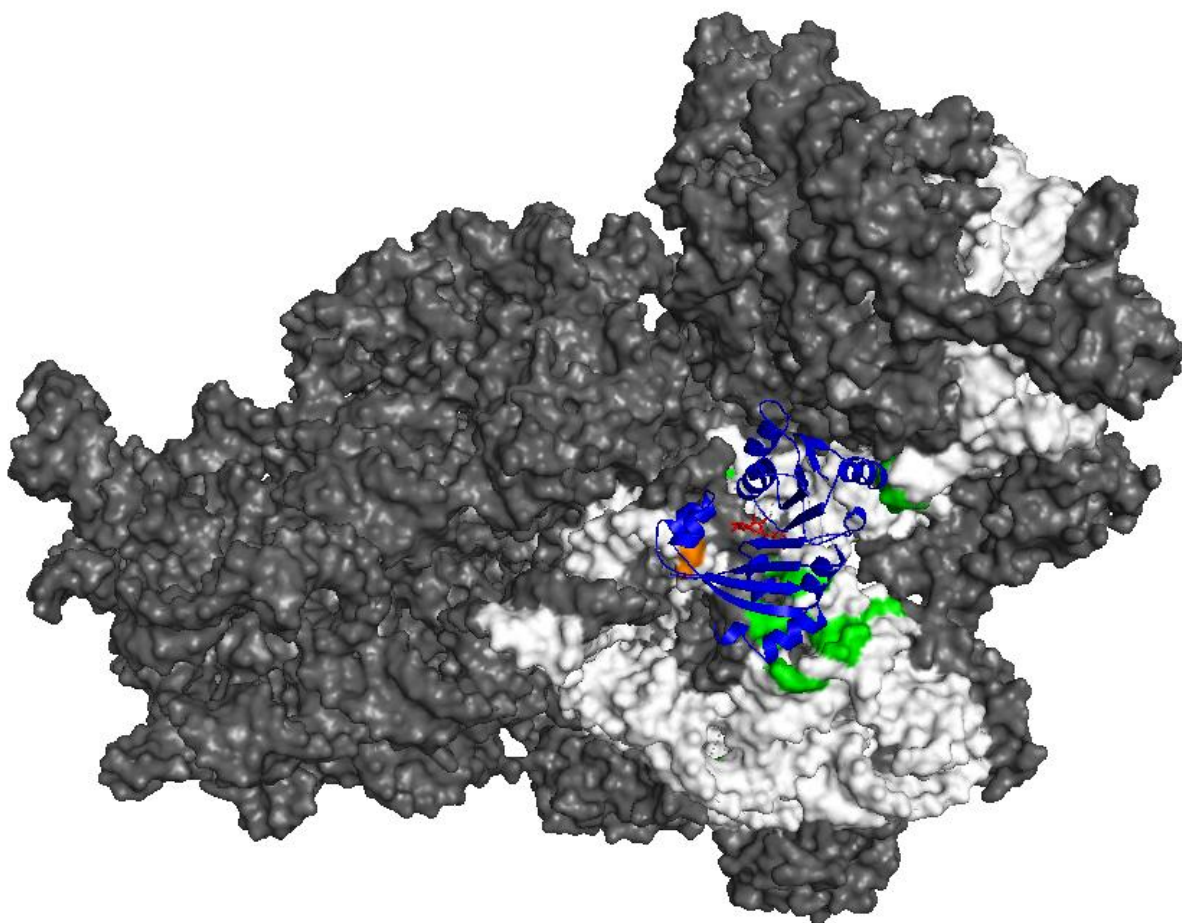


Ryc.56 Reszty aminokwasowe Trp 107 oraz Trp197 odpowiedzialne za wiązanie modyfikowanej adenozyiny w enzymie NpmA związanym z AdoMet.

#### 4.2.2.2 Dokowanie enzymu NpmA do rybosomu

NpmA zostało zadokowane programem GRAMM [155] do fragmentu 16S rRNA podjednostki 30S w rybosomie bakteryjnym. Uzyskane 10000 struktur przefiltrowano programem FILTREST [156] pod kątem wybrania konformacji, gdzie atom N1 z modyfikowanej adenozyiny 1408 jest położony blisko grupy metylowej w AdoMet. Najlepsze 100 wyników zostało sklastrowane programem MAXCLUSTER [157]. Kończącym etapem pracy było zastąpienie fragmentu RNA, służącego jako cel dokowania, przez całą podjednostkę 30S rRNA. Dzięki temu możliwe stało się wybranie reprezentatywnego modelu, w którym NpmA nie wykazuje zawał sterycznych z rybosomem (Ryc. 57). W otrzymanych modelach białko NpmA przylega do rRNA i jego centrum katalityczne jest położone blisko A1408, co sugeruje, że do zajścia reakcji metylacji znaczące zmiany konformacyjne prawdopodobnie nie są konieczne. Hipotezę tę wspierają wyniki doświadczeń, wskazujące, że NpmA działa na złożonej strukturze 30S [158]. Wzajemne położenie kofaktora,

modyfikowanej adenozyne ze strony RNA i Trp107 oraz Trp197 ze strony białka wskazuje, że jest to bardzo prawdopodobna konformacja. Dodatkowo badania doświadczalne prowadzone przez grupę dr Maravić w Zagrzebiu dzięki którym udało się zidentyfikować nukleotydy na powierzchni rybosomu a chronione przez wiążący się do RNA enzym, potwierdzają zasadność proponowanego na Ryc.57 modelu kompleksu NpmA-rybosom. Ponadto nieuporządkowana pętla 144-159 leży na płaszczyźnie interakcji NpmA z rRNA, przez co zasadna jest teza, że ten fragment białka dostosowuje swoją konformację dopiero w obecności metylowanego substratu.



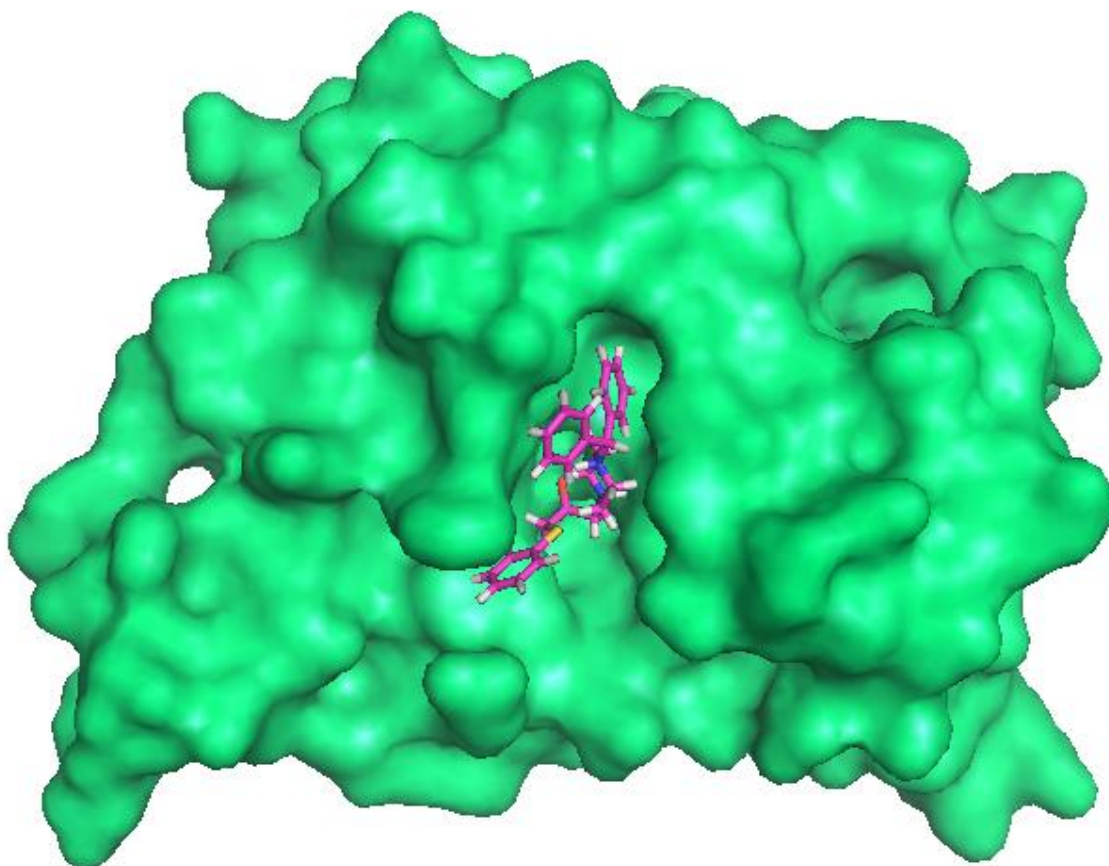
Ryc.57 NpmA związane do 30S rRNA. Białko jest zaznaczone na niebiesko, rybosom – na szaro. Na biało oznaczone są fragmenty RNA badane doświadczalnie. Na powierzchni rybosomu na zielono zaznaczone są nukleotydy doświadczalnie uznane jako chronione przez NpmA. Modyfikowana adenozyne oznaczona jest na powierzchni rybosomu na pomarańczowo, natomiast AdoMet przedstawiony jest jako czerwona cząsteczka pośrodku białka.

Model oddziaływania NpmA z rybosomem zaprezentowany powyżej został opisany w publikacji razem ze strukturą krystalograficzną NpmA i badaniami doświadczalnymi.

#### 4.2.2.3 Poszukiwanie inhibitorów metylotransferazy NpmA

Kolejnym etapem analiz białka NpmA było przeprowadzenie wirtualnego badania przesiewowego w celu zidentyfikowania potencjalnych inhibitorów tego enzymu. W tym celu przy pomocy programu DOCK zadokowana została do tego białka baza ligandów Maybridge.

Uzyskany rezultat napawa optymizmem, gdyż udało się znaleźć cząsteczki inhibitorów bardzo wysoko oceniane przez DOCK oraz doskonale pasujące do kieszeni katalitycznej enzymu. Dodatkowo ligand swoim położeniem blokuje nie tylko wiązanie kofaktora, ale także modyfikowanego nukleotydu, ponieważ zajmuje on miejsce zarówno kofaktora jak i modyfikowanej adenozy. Można także zaobserwować, że jeden z pierścieni aromatycznych inhibitora wchodzi pomiędzy Trp107 oraz Trp197, uniemożliwiając umiejscowienie się tam modyfikowanej adenozy. Proponowany inhibitor na powierzchni białka pokazany jest na Ryc.58.



Ryc.58 Powierzchnia NpmA z zadokowanym inhibitorem.

## 5. Dyskusja

Projekt dotyczący ErmC' służył zbadaniu substratu RNA, samego białka oraz ich płaszczyzn interakcji. Końcowym etapem było poszukiwanie inhibitorów blokujących przeprowadzaną przez ErmC' metylację rybosomu, prowadzącą do oporności na antybiotyki z grupy MLS<sub>B</sub>.

W projekcie ErmC' przeprowadzono dwie symulacje minimalnego substratu RNA. Ze względu na jego wykazaną labilność (Ryc.23), dzięki wykorzystaniu programu MCSym, został skonstruowany nowy, stabilny strukturalnie model substratu RNA (Ryc.24).

W analizie białka ErmC' za pomocą metody dynamiki molekularnej została stwierdzona wysoka stabilność cząsteczki tego enzymu oraz niewielkie zmiany konformacyjne białka podczas symulacji. Jedynym mocno ruchomym elementem ErmC' był koniec N, niewidoczny w strukturze krystalograficznej (najprawdopodobniej na skutek nieuporządkowania) i dodany do modelu białka. Przypuszcza się, że ww. fragment białka przyjmuje stabilną konformację dopiero po związaniu substratu RNA. W czasie trwania projektu wyodrębniono fluktuacje wzdłuż wektorów własnych, pokazujące oddziaływania występujące w białku ErmC', czego nie udało się wywnioskować z samego wglądu w trajektorię dynamiki molekularnej. Analiza ww. białka (Ryc. 27) pozwoliła wykazać liczne korelacje między resztami aminokwasowymi. Korelacja pozytywna między resztami Phe35, Lys97 oraz Ile123 (Ryc. 28) wskazuje na homogenność domeny N-końcowej białka ErmC'. Z kolei liczne korelacje negatywne stanowią ważną sugestię, jak może być wiązany kofaktor oraz substrat RNA. Korelacja negatywna Thr14 z grupą reszt: Gln87, Asp117 oraz Ala148 (Ryc. 29) przecina miejsce wiązania AdoMet, co sugeruje, że białko ErmC' może lekko powiększać kieszeń wiążącą kofaktor. Analogiczną zależność daje się zaobserwować w przypadku kieszeni wiążącej modyfikowany nukleotyd A2058 (Ryc. 30 – korelacja negatywna Glu69 z grupą reszt Gly130, Phe145 oraz Ser153). Z punktu widzenia niniejszej pracy bardzo istotne okazały się wykryte korelacje negatywne mogące sugerować sposób wiązania substratu RNA. Jak widać z ryciny 31, Lys168 koreluje negatywnie z grupą reszt Asn33, Val55, Gln79 oraz Ser95. Z tą samą grupą ww. czterech reszt aminokwasowych korelują Arg134 oraz Arg140 (Ryc. 32). Oprócz tego reszty Lys168, Arg134 oraz Arg140 znajdują się w sąsiedztwie kieszeni na modyfikowaną A2058, co pozwala przypuszczać, że ww. reszty mają wpływ na wiązanie substratu RNA.

Również wiele istotnych informacji uzyskano podczas badania poprzednio zaproponowanej struktury kompleksu ErmC' z minimalnym substratem RNA, za pomocą dynamiki molekularnej (Ryc. 33). Wzajemna prostopadła konformacja tych cząsteczek okazała się być niestabilna (Ryc. 34 oraz Ryc. 35), a substrat RNA wykazywał tendencję do oddyfundowywania od białka ErmC' z jednoczesnym skręcaniem się do ułożenia równoległego w stosunku do ww. enzymu.

Wyniki analizy wektorów własnych białka ErmC' oraz pierwotnej konformacji kompleksu tego enzymu z minimalnym substratem RNA doprowadziły do hipotezy, że substrat RNA może układać się równolegle do powierzchni białka, będąc jednocześnie w interakcji z resztami Arg 134, Arg 140 lub Lys 168. Powyższą hipotezę potwierdził rezultat dokowania makromolekularnego z użyciem programu HADDOCK (Ryc. 37 i Ryc. 38).

Kolejnym etapem projektu było poszukiwanie inhibitorów białka ErmC' z użyciem wirtualnego badania przesiewowego przeprowadzonego programem Surflex (Ryc.39). Wyniki przewidywań przeprowadzonych przez autora niniejszej tezy zostały przetestowane doświadczalnie przez współpracowników promotora pracy. Wyniki badań *in vitro* opublikowane przez autora i współpracowników w ChemMedChem potwierdziły możliwość inhibicji enzymu ErmC' przez jeden ze znalezionych związków. Związek BTB05276 wykazał stosunkowo niewielką zdolność inhibicji ErmC' i będzie musiał być zoptymalizowany (tzn. będą musiały być przetestowane jego pochodne) zanim można będzie uznać go za obiecujący związek wiodący w kierunku inhibicji ErmC'.

W części pracy dotyczącej enzymu RlmA(I) modyfikującego G745 w pozycji N1, do białka o znanej strukturze krystalograficznej (kod PDB: 1P91) został zadokowany programem DOCK donor grupy metylowej – AdoMet (Ryc. 41). Uzyskane wyniki pozwoliły zauważyć, że grupa metylowa AdoMet jest skierowana w stronę Tyr156 zaangażowanej w wiązanie modyfikowanej G745. Przeprowadzone dokowanie metylowanego nukleotydu wykazało, że G745 oddziałuje z Tyr156 i jest modyfikowana dzięki bliskiej obecności grupy metylowej AdoMet (Ryc. 42). Sprawdzone następnie, czy uzyskana konformacja G745 względem białka RlmA(I) jest zgodna z pozycją tej reszty nukleotydowej w substratowym rRNA, jeśli do powierzchni ww. enzymu zostanie zadokowana cała spinka 35 zawierająca modyfikowany nukleotyd. Rezultat uzyskany z dokowania molekularnego programem HADDOCK spinki 35 do białka RlmA(I) potwierdza położenie G745 uzyskane z dokowania

mikromolekularnego (Ryc. 43). Należy podkreślić, że zadokowany fragment RNA mieści się idealnie pośrodku struktury dimerycznej RlmA(I) bez zawałd sterycznych (Ryc. 44).

Białko RlmA(I) nie jest odpowiedzialne za bakteryjną oporność na antybiotyki, taką rolę pełni jego bliski homolog RlmA(II). Ze względu na to, że nie jest znana struktura krystalograficzna RlmA(II), konieczne było komputerowe wymodelowanie jego struktury. Dzięki metodzie modelowania homologicznego uzyskano model RlmA(II) (Ryc. 46, 47). Otrzymany model został oceniony metodą MetaMQAPII uzyskując wynik GDT\_TS=66,8, co wskazuje na jego względnie wysoką wiarygodność (Rys.48).

Do modelu białka RlmA(II) został zadokowany AdoMet przy wykorzystaniu programu DOCK (Ryc. 49). Następnie do uzyskanego kompleksu białka z kofaktorem został zadokowany ulegający modyfikacji nukleotyd G748 (Ryc. 50). W uzyskanym modelu grupa metylowa AdoMet skierowana jest w stronę modyfikowanego nukleotydu, a wzajemne położenie G748 oraz AdoMet pozwala przypuszczać, że to wiarygodny model oddziaływań. Pozycję G748 względem białka RlmA(II) potwierdza również dokowanie makromolekularne spinki 35 r RNA do RlmA(II) (Ryc. 51).

Ostatnim etapem w analizie białek RlmA(I)/RlmA(II) było poszukiwanie potencjalnych inhibitorów, którego dokonano metodą wirtualnego badania przesiewowego przy pomocy programu DOCK. Na Ryc. 52 pokazany jest proponowany inhibitor enzymu RlmA(II). Jest to o tyle obiecujący rezultat, że cząsteczka inhibitora zajmuje miejsce wiązania się modyfikowanego nukleotydu, a także część przestrzeni zajmowanej przez donor grupy metylowej, dzięki czemu może blokować wiązanie się każdej z ww. cząsteczek do białka RlmA(II).

W części pracy dotyczącej metylotransferaz przeprowadzających modyfikację m<sup>1</sup>A w 16S rRNA skupiono się na metylotransferazach z rodziny Kam. Pierwszą z nich była KamB modyfikująca A1408. Jako że w chwili przeprowadzania tej analizy nie była dostępna struktura KamB, przeprowadzono analizę sekwencyjną kilku członków rodziny Kam, a na podstawie wymodelowanej przez prof. Janusza Bujnickiego struktury enzymu został skonstruowany model oddziaływań KamB z modyfikowaną adenozyzną (Ryc. 53). Po opublikowaniu ww. modelu odkryta została homologiczna do KamB metylotransferaza NpmA. Analiza porównawcza sekwencji i struktur białek z rodziny Kam (w tym zwłaszcza NpmA) wykazała, że enzymy te są najbardziej podobne pod względem sekwencji i struktury do białek z rodziny TrmB przeprowadzających modyfikację m<sup>7</sup>G w tRNA (Ryc.54).

Metylotransferazy Kam i TrmB wykazują podobieństwa w budowie centrum aktywnego. Przymuszczalnie podobną rolę do istotnej dla wiązania substratu w NpmA reszty aminokwasowej Trp197, pełni w białkach TrmB Tyr193. Pozostałe fragmenty kieszeni katalitycznej są różne we wspomnianych białkach. Jest to uzasadnione ich różną specyfiką substratową, gdyż NpmA powoduje metylację adenozyiny w pozycji N1, natomiast białko TrmB metylację N7 w guanozynie. Wyżej wspomniane reszty umożliwiają stabilizowanie konformacji modyfikowanej zasady względem donora grupy metylowej.

Wyniki zmapowania konserwacji sekwencji na strukturę NpmA wykonane programem CONSURF pozwoliły zobaczyć, że najbardziej konserwowane są aminokwasy w kieszeni wiążącej kofaktor (kolor granatowy na Ryc.55). Widać również, że mocno konserwowane są Trp107 oraz Trp197 na brzegu kieszeni pełniące rolę wiążącą substrat.

Dzięki programowi GRAMM udało się uzyskać model oddziaływania białka NpmA z 30S rRNA. Ryc.57 ilustruje, że białko wiąże się do RNA i zasłania wiele nukleotydów wyznaczonych jako chronione w badaniach doświadczalnych.

Podobnie jak dla innych enzymów analizowanych w niniejszej pracy, przeprowadzono poszukiwanie potencjalnego inhibitora metylotransferazy NpmA z zastosowaniem wirtualnego badania przesiewowego. Cząsteczka pokazana na Ryc. 58 pokrywa swoją powierzchnią kieszeń wiążącą AdoMet i zachodzi na miejsce wiązania substratu.

Podsumowując, wyniki analiz opisanych w niniejszej pracy można stwierdzić, że znacząco rozszerzyły one wiedzę na temat metylotransferaz RNA, w tym enzymów odpowiedzialnych za bakteryjną oporność na antybiotyki. Zaproponowano modele oddziaływań enzymów ErmC', RlmA(I), RlmA(II), oraz NpmA z ich substratowymi RNA. Wykazano, że MTazy m<sup>1</sup>A z rodziny Kam (m.in. NpmA) są bliżej spokrewnione z MTazami m<sup>7</sup>G z rodziny TrmB niż z innymi MTazami m<sup>1</sup>A, co ma znaczenie dla poszukiwania specyficznych inhibitorów. Dla enzymów odpowiedzialnych za antybiotykooporność, tj. ErmC', RlmA(II) i NpmA przeprowadzono wirtualne badania przesiewowe i zaproponowano inhibitory blokujące miejsce wiązania substratu. Opisane wyniki mają znaczenie poznawcze dla zrozumienia mechanizmu działania metylotransferaz RNA oraz powstawania nowych specyficzności substratowych. Mają też znaczenie praktyczne: znalezione związki niskocząsteczkowe stanowią interesujący punkt wyjścia do identyfikacji nowych leków, które mogą pomóc w walce z zakażeniami powodowanymi przez antybiotykooporne bakterie.

## 6. Literatura

1. Dziubek Z., „Choroby zakaźne i pasożytnicze”, PZWL, 2003, wyd. 3.
2. Faruque S., Nair B., „*Vibrio Cholerae*, Genomics and Molecular Biology.”, *Caister Academic Press*, 2008.
3. Wagner D., Young L.S., „Nontuberculosis mycobacterial infections a clinical review.”, *Infection*, 2005, 32: 257-270.
4. Madsen C.T., Jakobsen L., Douthwaite S., „*Mycobacterium smegmatis* Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase.”, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 2005, 3803-3809.
5. Szczeklik A., „Choroby wewnętrzne: stan wiedzy na rok 2010.”, *Medycyna Praktyczna*, 2010: 846-847.
6. Dzierżanowska D., „Antybiotykoterapia praktyczna”, *Alfa Medica Press*, 2008, wyd. 4.
7. Waksman S.A., and Tishler M., „The Chemical Nature of Actinomycin, an Antimicrobial Substance Produced by *Actinomyces Antibioticus*.”, *J. Biol. Chem.*, 1942, 142: 519-528.
8. Fleming A., „Antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.”, *The British Journal of Experimental Pathology*, 1929, 10: 226.
9. Ozanne B., Benveniste R., Tipper D., Davies J., „Aminoglycoside antibiotics: inactivation by phosphorylation in *Escherichia coli* carrying R factors”, *J. of Bacteriol.*, 1969, 100: 1144-1146.
10. Hawkey P., „The origins and molecular basis of antibiotic resistance”, *BMJ*, 1998, 317: 657-660.
11. van Bambeke F., Glupczynski Y., Plesiat P., Pechere J.C., Tulkens P.M., „Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2001, 51(5): 1055-1065.
12. Walsh C., „Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance.”, *Nature*, 2000, 406: 775-781.

13. Lai C.J, and Weisblum B., „Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, 68: 856–860.
14. Berisio R., Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Hansen H.A., Fucini P., Yonath A., „Structural insight into the antibiotic action of telithromycin against resistant mutants.”, *J. of Bacteriol.*, 2003, 185: 4276-4279.
15. Poehlsgaard J., Douthwaite S., „The bacterial ribosome as a target for antibiotics”, *Nature Reviews*, 2005, 3: 870-881.
16. Poehlsgaard J., Douthwaite S., „The macrolide binding site on the bacterial ribosome.”, *Curr. Drug Targets – Infectious Disorders*, 2002, 2: 67-78.
17. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., „Biochemia”, WNT, 2005.
18. Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P.B., Steitz T.A., „The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution.”, *Science*, 2000, 289: 905-920.
19. Fourmy D., Recht M., Blanchard S.C., Puglisi J.D., „Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with aminoglycoside antibiotic.”, *Science*, 1996, 274: 1367-1371.
20. Vicens Q., Westhof E., „Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide”, *J. Mol. Biol.*, 2003, 326: 1175-1188.
21. Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P.B., Steitz T.A., „The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis”, *Science*, 2000, 289: 920-930.
22. Tu D., Blaha G., Moore P.B., Steitz T.A., „Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance.”, *Cell*, 2005, 121: 257-270.
23. Schluenzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F., „Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria.”, *Nature*, 2001, 413: 814-821.
24. Harms J.M., Schluenzen F., Fucini P., Bartels H. Yonath A., „Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the straptogramins dalfoipristin and quinipristin.”, *BMC Biol.*, 2004, 2: 4.

25. Hansen J.L., Ippolito J.A., Ban N., Nissen P., Moore P.B., Steitz T.A., „The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit.”, *Mol. Cell.*, 2002, 10: 117-128.
26. Hansen J.L., Moore P.B., Steitz T.A., „Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase centre of the large ribosomal subunit.”, *J. Mol. Biol.*, 2003, 330: 1061-1075.
27. Poulsen S.M., Kofoed C., Vester B., „Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin.”, *J. Mol. Biol.*, 2000, 304: 471-481.
28. Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P.B., and Steitz T.A., „Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit.”, *Nature*, 1999, 400: 841-847.
29. Cate J.H., Yusupov M.M., Yusupova G.Z., Earnest T.N., and Noller H.F., „X - ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes.”, *Science*, 1999, 285: 2095-2104.
30. Weisblum B., „Erythromycin resistance by ribosome modification.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39: 577-585.
31. Weisblum B., „Macrolide resistance.”, *Drug Resistance Updates*, 1998, 1: 29-41.
32. Gabashvili I.S., Gregory S.T., Valle M., Grassucci R., Worbs M., Wahl M.C., Dahlberg A.E., and Frank J., „The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22.”, *EMBO J.*, 2001, 8: 181-188.
33. Hansen L. H., Mauvais P., and Douthwaite S., „The macrolide-ketolide antibiotic binding site is formed by structures in domains II and V of 23S ribosomal RNA.”, *Mol. Microbiol.*, 1999, 31: 623–632.
34. Xiong L., Shah S., Mauvais P., and Mankin A.S., „A ketolide resistance mutation in domain II of 23S rRNA reveals proximity of hairpin 35 to the peptidyl transferase centre.”, *Mol. Microbiol.*, 1999, 31: 633–639.
35. Berisio R., Schluenzen F., Harms J., Bashan A., Auerbach T., Baram D., Yonath A., „Structural insight into the role of the ribosomal tunnel in cellular regulation”, *Nat. Struct. Biol.*, 2003, 10: 366-370.

36. Douthwaite S., „Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center.”, *J. Bacteriol.*, 1992, 174: 1333-1338.
37. Porse B.T., and Garrett R.A., „Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms.”, *J. Mol. Biol.*, 1999, 286: 375-387.
38. Gutell R.R., Larsen N., and Woese C.R., „Lessons from anM evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective.”, *Microbiol. Rev.*, 1994, 58: 10-26.
39. Dunkle J.A., Xiong L., Mankin A.S., Cate J.H., „Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action.”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17152-17157.
40. Martinez F.J., Curtis J.L., and Albert R., „Role of macrolide therapy in chronic obstructive pulmonary disease.”, *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.*, 2008, 3(3): 331-350.
41. Blasi F., Aliberti S., and Tarsia P., „Clinical applications of azithromycin microspheres in respiratory tract infections.”, *Int J Nanomedicine.*, 2007, 2(4): 551-559.
42. Berg H.F., Maraha B., Scheffer G.J., Peeters M.F., and Kluytmans J.A.J.W., „Effect of Clarithromycin on Inflammatory Markers in Patients with Atherosclerosis.”, *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2003, 10(4): 525-528.
43. Zhanel GG, Dueck M, Hoban DJ, et al., „Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections.”, *Drugs*, 2001, 61: 443-498.
44. Vester B., and Douthwaite S., „Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, 45: 1-12.
45. Skinner R., Cundliffe E., Schmidt F.J., „Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics”, *J. of Biol. Chem.*, 1983, 258(20): 12702-12706.
46. Bryskier A., „Ketolides – telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents.”, *Clin. Microbial Infect.*, 2000, 6: 661-669.
47. Kasbekar N., Acharya P.S., „Telithromycin: the first ketolide for the treatment of respiratory infections.”, *J. Health Syst Pharm*, 2005, 62: 905-916.

48. Leclercq R., and Courvalin P., „Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991, 35: 1267-1272.
49. Weisblum B., „Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance””, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, 39(4): 797-805.
50. Duval J., „Evolution and epidemiology of MLS resistance””, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1985, 26: 137-149.
51. Su S.L., Dubnau D., „Binding of *Bacillus subtilis* ErmC' methyltransferase to 23S ribosomal RNA””, *Biochemistry*, 1990, 29: 6033-6042.
52. Arthur M., Brisson-Noel A., Courvalin P., „Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses.””, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1987, 20: 732-802.
53. Weisblum B., and Demohn V., „Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved.””, *J. Bacteriol.*, 1969, 98: 447-452.
54. Blaha G., Gurel G., Schroeder S.J., Moore P.B., Steitz T.A., „Mutations outside the anisomycin-binding site can make ribosomes drug-resistant.””, *J.Mol.Biol.*, 2008, 379: 505-519.
55. Douthwaite S., Hansen L.H., and Mauvais P., „Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA.””, *Mol. Microbiol.*, 2000, 36: 183-193.
56. Pardo D. and Rosset R., „Genetic studies of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli*.””, *Mol. Gen. Genet.*, 1974, 135: 257-268.
57. Tait-Kamradt A., Davies T., Cronan M., Jacobs M.R., Appelbaumand P.C., Sutcliffe J., „Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage.””, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44: 2118-2125.
58. Wittmann H.G., Stoffler G., Apirion D., Rosen L., Tanaka K., Tamaki M., Takata R., Dekio S., and Otaka E., „Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins.””, *Mol. Gen. Genet.*, 1973, 127: 175-189.

59. Fischbach M.A. and Walsh C.T., „Antibiotics For Emerging Pathogens”, *Science*. 2009, 325(5944): 1089-1093.
60. Doornenbal H., „Clinical Evaluation of Tylosin as a Treatment of Vibronic Dysentery in Swine”, *Can J Comp Med Vet Sci.*, 1965, 29(7): 179-182.
61. Bate N., Butler A. R., Gandechea A. R. & Cundliffe E., “Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*”, *Chem. Biol.*, 1999, 6: 617-624.
62. Liu M., Kirpekar F., van Wezel G.P., Douthwaite S., „The tylosin resistance gene tlrB of *Streptomyces fradiae* encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA”, *Mol. Microbiol.*, 2000, 37: 811-820.
63. Liu M., Douthwaite S., „Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy”, *PNAS*, 2002, 99(23): 14658-14663.
64. Douthwaite S. „Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S rRNA.”, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 18: 4717-4720.
65. Arevalo M.A., Tejedor F., Polo F., and Ballesta J.P., „Protein components of the erythromycin binding site in bacterial ribosomes.”, *J. Biol. Chem.*, 1988, 263: 58-63.
66. Menninger J.R., and Otto D.P., „Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1982, 21: 811-818.
67. Cheng X., Roberts R.J., „AdoMet-dependent metylation, DNA methyltransferases and base flipping”, *NAR*, 2001, 29: 3784-3795
68. Denoya C.D., Dubnau D., „Site and substrate specificity of the ermC 23S rRNA methyltransferase”, *J. Bacteriol.*, 1987, 169: 3857-3860.
69. Denoya C., Dubnau D., „Mono- and dimethylating activities and kinetic studies of the ermC 23S rRNA methyltransferase”, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264: 2615-624.
70. Villsen I.D., Vester B., Douthwaite S., „ErmE methyltransferase recognizes features of the primary and secondary structure in a motif within domain V of 23S rRNA”, *J. Mol. Biol.*, 1999, 286: 365-374.

71. Vester B., Douthwaite S., „Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase”, *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 6999-7004.
72. Zhong P., Pratt S.D., Edalji R.P., Walter K.A., Holzman T.F., Shivakumar A.G., Katz L., „Substrate requirements for ErmC' methyltransferase activity”, *J. Bacteriol.*, 1995, 177(15): 4227-4332.
73. Vester B., Nielsen A.K., Hansen L.H., Douthwaite S., „ErmE methyltransferase recognition elements in RNA substratem.”, *J.Mol.Biol.*, 1998, 282: 255-264.
74. Nielsen A.K., Douthwaite S., Vester B., „Negative in vitro selection identifies the rRNA recognition motif for ErmE methyltransferases.”, *RNA*, 1999, 5: 1034-1041.
75. Hansen L.H., Vester B., Douthwaite S., „Core sequence in the RNA motif recognized by the ErmE methyltransferase revealed by relaxing the fidelity of the enzyme for its target.”, *RNA*, 1999, 5: 93-101.
76. Maravic G., Bujnicki J.M., Feder M., Pongor S., Flogel M., „Alanine – scanning mutagenesis of the predicted rRNA – binding domain of ErmC' redefines the substrate – binding site and suggests a model for protein – RNA interactions”., *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(16): 4941-4949.
77. Bussiere D.E., Muchmore S.W., Dealwis C.G., Schluckebier G., Nienaber V.L., Edalji R.P., Walter K.A., Lador U.S., Holzman T.F., Abad-Zapatero C., „Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria.”, *Biochemistry*, 1998, 37: 7103-7112.
78. Schluckebier G., Zhong P., Stewart K.D., Kavanaugh T.J., Abad-Zapatero C., „The 2,2Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism.”, *J.Mol.Biol.*, 1999, 289: 277-291.
79. Gasteiger E., Jung E., Bairoch A., „SWISS-PROT: Connecting biological knowledge via a protein database”, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2001, 3: 47-55
80. Maravic G., Feder M., Pongor S., Flogel M., Bujnicki J.M., „Mutational analysis defines the roles of conserved amino acid residues in the predicted catalytic pocket of the rRNA: m<sup>6</sup>A methyltransferase ErmC'”, *J. Mol. Biol.*, 2003, 332: 99-109.
81. Schluckebier G., O'Gara M., Saenger W., Cheng X., „Universal catalytic domain structure of AdoMet-dependent methyltransferases.”, *J. Mol.Biol.*, 1995, 247: 16-20.

82. Maravic G., Bujnicki J.M., Flogel M., „Mutational analysis of basic residues in the N-terminus of the rRNA: m<sup>6</sup>A methyltransferase ErmC'.”, *Folia Microbiol.* 2004, 49(1): 3-7.
83. Gustafsson C., Persson B.C., „Identification of the rrmA gene encoding the 23S rRNA m<sup>1</sup>G745 methyltransferase in *Escherichia coli* and characterization of an m<sup>1</sup>G745 – deficient mutant.”, *J. Bacteriol.*, 1998, 180: 359-365.
84. Liu M., Douthwaite S., „Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria.”, *Mol. Microbiol.*, 2002, 44: 195-204.
85. Liu M., Novotny G.W., Douthwaite S., „Methylation of 23S rRNA nucleotide G745 is a secondary function of the RlmA(I) methyltransferase.”, *RNA*, 2004, 10: 1713-1720.
86. Hansen L.K., Kirpekar F., Douthwaite S., „Recognition of Nucleotide G745 in 23S Ribosomal RNA by the RrmA methyltransferase”, *J. Mol. Biol.*, 2001, 310: 1001-1010.
87. Wilson V., Cundliffe E., „Molecular analysis of tlrB, an antibiotic – resistance gene from tylosin producing *Streptomyces fradiae* and discovery of a novel resistance mechanism”, 1999, 52: 288-296.
88. Fouces R., Mellado E. Diez B., Barredo J.L., „The tylosin biosynthetic cluste from *Streptomyces fradiae*: genetic organization of the left region.”, *Microbiology*, 1999, 145: 855-868.
89. Douthwaite S., Jakobsen L., Yoshizawa S., Fourmy D., „Interaction of the Tylosin-resistance Methyltransferase RlmAII an its rRNA target differs from the orthologue RlmAI.”, *J. Mol. Biol.*, 2008, 378: 969-975.
90. Bujnicki J.M., Blumenthal R.M., Rychlewski L., „Sequence analysis and structure prediction of 23S rRNA m<sup>1</sup>G methyltransferases reveals conserved core augmented with a putative Zn – binding domain in the N – terminus and family specific elaborations in the C – terminus.”, *J. Mol. Micro. Biotechnol.*, 2005, 4: 93-99.
91. Kagan R.M., Clarke S., „Widespread occurrence of three motifs in diverse S adenosylmethionine – dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes.”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1994, 310: 417-427.

92. Lebars I., Yoshizawa S., Stenholm A.R., Guittet E., Douthwaite S., Fourmy D., „Structure of 23SrRNA hairpin 35 and its interaction with the tylosin resistance methyltransferase RlmA(II).”, *EMBO J.*, 2003, 22: 183-192.
93. Das K., Acton T., Chiang Y., Shih L., Arnold E., Montelione G.T., „Crystal structure of RlmA': Implications for understanding the 23S rRNA G745/G748 – methylation at the macrolide antibiotic-binding site.”, *PNAS*, 2004, 101(12): 4041-4046.
94. Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S., „Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, 44: 3249-3256.
95. Magnet S., Blanchard J.S., „Molecular insights into aminoglycoside action and resistance.”, *Chem Rev*, 2005, 105: 477-498.
96. Borovinskaya M.A., Pai R.D., Zhang W., Schuwirth B.S., Holton J.M., Hirokawa G., Kaji H., Kaji A., Cate J.H., „Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling.”, *Nat.Struct.Mol.Biol.*, 2007, 14: 727-732.
97. Borovinskaya M.A., Shoji S., Holton J.M., Fredrick K., Cate J.H., „A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin.”, *Acs Chem.Biol.*, 2007, 2: 545-552.
98. Borovinskaya M.A., Shoji S., Fredrick K., Cate J.H.D., "Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis", *Rna*, 2008, 14: 1590-1599.
99. Griffey R.H., Hofstadler S.A., Sannes-Lowery K.A., Ecker D.J., and Crooke S.T., „Determinants of aminoglycoside-binding specificity for rRNA by using mass spectrometry.”, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18): 10129-10133.
100. Thompson J., Skeggs P.A., Cundliffe E., „Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to the aminoglycoside antibiotics gentamycin and kanamyciin determined by DNA from the gentamycin – producer *Micromonospora purpurea*.”, *Mol.Gen.Genet.*, 1985, 201: 168-173
101. Cundliffe E., „How antibiotic – producing organisms avoid suicide.”, *Rev. Microbiol.*, 1989, 43: 207-233.
102. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH., „Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.”, *Microbiol Rev.*, 1993, 57: 138-163.

103. Jana S, Deb J.K., „Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance.”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70: 140-150.
104. Poole K., „Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49: 479-487.
105. Bogaerts P., Galimand M., Baraing C., Deplano A., Vanhoof R., Mendoca R., Rodriguez – Villalobos D., Struelens M., Glupczynski Y., „Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium”, *J.Antimicrob. Chemother.*, 2007, 59: 459-464.
106. Yamane K., Wachino J., Doi Y., Kurokawa H., Arakawa Y., „Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes”, *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11: 951-953.
107. Beauclerk A.A., Cundliffe E., „Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides.”, *J.Mol.Biol.*, 1987, 193: 661-671.
108. Skeggs P.A., Holmes D.J., Cundliffe E., „Cloning of aminoglycoside – resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other actinomycetes.”, *J.Gen.Microbiol.*, 1987, 133: 915-923.
109. Holmes D.J., Drocourt D., Tiraby G., Cundliffe E., „Cloning of an aminoglycoside – resistance – encoding gene, kamC, from *Saccharopolyspora hirsuta*: comparison with kamB from *Streptomyces tenebrarius*”, *Gene*, 1991,102: 19-26.
110. Gonzalez-Zorn B., Teshager T., Casas M., Porrero M.C., Moreno M.A., Courvalin P., Dominguez L., „ArmA and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*.”, *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 954-956.
111. Ohta T., Hasegawa M., „Analysis of the nucleotide sequence of *fmrT* encoding the self-defense gene of the istamycin producer, *Streptomyces tenjimariensis* ATCC 31602; comparison with the sequences of kamB of *Streptomyces tenebrarius* NCIB 11028 and kamC of *Saccharopolyspora hirsuta* CL102.”, *J. Antibiot.* 1993, 46: 511-517.
112. Wachino J., Shibayama K., Kurokawa H., Kimura K., Yamane K., Suzuki S., Shibata N., Ike Y., Arakawa Y., „Novel plasmid – mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase NpmA found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, 51(12): 4401-4409.

113. Savic M., Lovric J., Tomic T.I., Vasiljevic B., Conn G.L., „Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics.”, *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(16): 5420-5431.
114. Beauclerk A.A., Cundliffe E., „Sites of action of two ribosomal RNA methylases responsible for resistance to aminoglycosides.”, *J. Mol. Biol.*, 1987, 193: 661-671.
115. Mehta R. and Champney W.S., „30S ribosomal subunit assembly is a target for inhibition by aminoglycosides in *Escherichia coli*.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46: 1546-1549.
116. Champney, W.S., „The other target for ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation.”, *Infect. Disord. Drug Targets*, 2006 6: 377-390.
117. Yoshizawa S., Fourmy D., Puglisi J.D., „Structural origins of gentamicin antibiotic action.”, *EMBO J.*, 1998, 17: 6437-6448.
118. Vicens Q. and Westhof E., „Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site.”, *Chem. Biol.*, 2002, 9: 747-755.
119. Yokoyama K., Doi Y., Yamane K., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Yagi T., Kato H., Arakawa Y., „Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*.”, *Lancet*, 2003, 362: 1888-1893.
120. Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P. and Lambert, T., „Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548.”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, 49: 2949-2953.
121. Karplus M., McCammon J.A., “Molecular dynamics simulations of biomolecules”, *Nature Structural Biology*, 2002, 9: 646-652.
122. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M., „CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations.”, *J. Comp. Chem.*, 1983, 4: 187-217.
123. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M. Jr, Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995), „A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules.”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117: 5179-5197.

124. Grubmuller H., Heller H., Windemuth A., Schulten K., „Generalized Verlet algorithm for efficient molecular dynamics simulations with long-range interactions.”, *Molecular Simulation*, 1991, 6: 121-142.
125. van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C., „A Leap-frog Algorithm for Stochastic Dynamics”, *Molecular Simulation*, 1988, 1(3): 173-185.
126. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H. and Pedersen L.G., „A Smooth Particle Mesh Ewald Method.”, *J. Chem. Phys.*, 1995, 103: 8577.
127. Fedoryuk, M.V., „Method of steepest descent”, Springer Encyclopaedia of Mathematics, 2001.
128. Berendsen H.J.C., van der Spoel D. and van Drunen R., „GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation.”, *Comp. Phys. Comm.*, 1995, 91: 43-56.
129. Ewing T.J., Makino S., Skillman A.G., Kuntz I.D., „DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases.”, *J Comput Aided Mol. Des.*, 2001,15(5): 411-428.
130. Kuntz I.D., Blaney J.M., Oatley S.J., Landgridge R., Ferrin T.E., „A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions”, *J. Mol. Biol.*, 1982, 161: 269-288.
131. Jain A.N., „Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine”, *J Med Chem.* 2003, 46(4): 499-511.
132. Irwin J.J. and Shoichet B.K., „ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening.”, *J. Chem Inf Model.*, 2005, 45(1): 177-182.
133. Wang R., Lai L., Wang S., „Further Development and Validation of Empirical Scoring Functions for Structure - Based Binding Affinity Prediction.”, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 2002, 16: 11-26.
134. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E., „UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.”, *J Comput Chem*, 2004, 25: 1605-1612.
135. Richards FM, „Areas, volumes, packing and protein structure.”, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, 6: 151-176.

136. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A. M. J. J., „HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information.", *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 1731-1737.
137. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., „Basic local alignment search tool.”, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215 (3): 403-410.
138. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J., „Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.", *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389-3402.
139. Guex, N. and Peitsch, M.C., „SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.", *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
140. Sali A., Blundell T.L., „Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.", *J. Mol. Biol.*, 1993, 234: 779-815.
141. Bowie JU, Lüthy R, Eisenberg D, "A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure", *Science*, 1991, 253(5016): 164-170.
142. Pawlowski M., Michal J Gajda, Ryszard Matlak, Bujnicki J. M., „MetaMQAP: A meta-server for the quality assessment of protein models", *BMC Bioinformatics* 2008, 9: 403.
143. Rohl CA, Strauss CE, Misura KM, Baker D., „Protein structure prediction using Rosetta.", *Meth. Enzymol*, 2004, 383: 66-93.
144. Metropolis N., „The beginning of the Monte Carlo method.”, *Los Alamos Science*, 1987: 125-130.
145. Major F., Turcotte M., Gautheret D., Lapalme G., Fillion E., Cedergren R., "The combination of symbolic and numerical computation for three-dimensional modeling of RNA.", *Science*, 1991, 253: 1255-1260.
146. DeLano W.L., „The PYMOL Molecular Graphics System”, DeLano Scientific, 2002.
147. van Rossum G. et al., Python Language Website, <http://www.python.org/>
148. Humphrey W., Dalke A., Schulten K., „VMD - Visual Molecular Dynamics.", *J. Molec. Graphics*, 1996, 14: 33-38.

149. Nelson M., Humphrey W., Gursoy A., Dalke L., Kale L., Skeel R.D., Schulten K., „NAMD - A parallel object-oriented molecular dynamics program.”, *J. Supercomput. Appl.*, 1996, 10: 251-268.
150. Wang R., Lai L., Wang S., „Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction”, *J. Comput-Aided Mol. Des.*, 2002, 16: 11-26.
151. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E., „The Protein Data Bank.”, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 235-242.
152. Kurowski M.A., Bujnicki J.M., „GeneSilico protein structure prediction meta-server.”, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31(13): 3305-3307.
153. Holm L., Rosenström P., „Dali server: conservation mapping in 3D.”, *Nucl. Acids Res.*, 2010, 38: 545-549.
154. Armon A., Graur D. and Ben-Tal N., „ConSurf: An Algorithmic Tool for the Identification of Functional Regions in Proteins by Surface-Mapping of Phylogenetic Information.”, *J. Mol. Biol.*, 2001, 307: 447-463
155. Vakser IA, "Evaluation of GRAMM low-resolution docking methodology on the hemagglutinin-antibody complex.", *Proteins*, 1997, 1: 226-230.
156. Gajda M.J., Tuszynska I., Kaczor M., Bakulina A.Y. and Bujnicki J.M., „FILTREST3D: discrimination of structural models using restraints from experimental data", *Bioinformatics*, 2010, 10: 1093.
157. MAXCLUSTER, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~maxcluster/index.html>
158. Wachino J., Shibayama K., Kurokawa H., Kimura K., Yamane K., Suzuki S., Shibata N., Ike Y., and Arakawa Y., „Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m1A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides.”, *Antimicrobial agents and Chemotherapy.*, 2007, 4401-4409.