



**SZKOŁA DOKTORSKA  
BioMedChem**

Uniwersytetu Łódzkiego  
i Instytutów Polskiej  
Akademii Nauk w Łodzi



## **Daria Zygała-Pytlos**

Praca doktorska:

**Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych do  
optymalizacji inhibitorów gyrazy  
*Mycobacterium tuberculosis***

Doctoral thesis:

**Utilization of evolutionary patterns for  
the optimization of *Mycobacterium  
tuberculosis* gyrase inhibitors**

- Promotor/Supervisor  
**dr hab. Anna Brzostek, prof. IBM PAN**  
Instytut Biologii Medycznej  
Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

*Pragnę serdecznie podziękować całemu zespołowi Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium, osobom, które towarzyszyły mi podczas realizacji pracy magisterskiej oraz doktorskiej. Dziękuję za Wasze wsparcie, wszelkie rady, wskazówki i dzielenie się doświadczeniem. Dziękuję za możliwość podzielenia każdej wątpliwości, za rozmowy oraz zwyczajną ludzką życzliwość.*

*Szczególne podziękowania składam Pani dr hab. Annie Brzostek, prof. IBM PAN oraz Pani dr Alinie Minias za pomoc w trakcie pracy nad doktoratem, wsparcie w realizacji eksperymentów i kompletowaniu dokumentacji. Dziękuję za cenną wiedzę, cierpliwość oraz poświęcony czas mimo ogromu własnych zajęć. Za nadanie kierunku niniejszych badań, a także finasowanie.*

*Serdecznie dziękuję Panu prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi za możliwość dołączenia do zespołu i dalszej współpracy. Za przeświadczenie, że nie ma problemu, którego nie da się rozwiązać ani wyniku bez logicznego wyjaśnienia.*

*Dziękuję również mojej Mamie i Babci za troskę, wychowanie i wsparcie na każdym etapie edukacji i życia.*

*Dziękuję Mężowi za obecność, oparcie i wyrozumiałość. Dziękuję za zrozumienie, że to nauka i realizacja eksperymentów były najważniejsze.*

*Dziękuję każdej osobie, która towarzyszyła mi w tej wymagającej drodze.*



Praca doktorska została zrealizowana w ramach grantu  
SONATA BIS 9 2019/34/E/NZ6/00221  
„Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych w optymalizacji chemioterapii gruźlicy”  
finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Kierownik projektu: dr Alina Minias

## Dorobek naukowy

### Publikacje:

- Minias A., Żukowska L., Lechowicz E., Gąsior F., Knast A., Podlewska S., **Zygała D.**, Dziadek J. *Early Drug Development and Evaluation of Putative Antitubercular Compounds in the -Omics Era*. *Frontiers in Microbiology*. 11:618168 (2021).
- Żukowska L., **Zygała-Pytlos D.**, Struś K., Zabost A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Dziadek J., Minias A. *An overview of tuberculosis outbreaks reported in the years 2011–2020*. *BMC Infect Dis.*, 23(1):253 (2023).
- Kozińska M., Filipczak D., Klatt M, Dziadek J., Minias A., **Zygała-Pytlos D.**, Makarevich T., Augustynowicz-Kopeć E. *Changes in the epidemiological situation of multidrug-resistant tuberculosis in Poland in 2018-2022*. *Pol Arch Intern Med.*, 135(1):16904 (2025).
- Minias A., Fiedorowicz L., Szulc-Kiełbik I., Kozińska M., Zabost A., **Zygała-Pytlos D.**, Struś K., Słomka M., Lach J., Strapagiel D., Dziadek J., Augustynowicz-Kopeć E. *Reduced fitness and enhanced immunogenicity of M. tuberculosis ural family isolates limit global spread*. *Curr Res Microb Sci.*, 9:100488 (2025).
- **Zygała-Pytlos D.**, Kuzioła M., Wrońska N., Zabost A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Dziadek J., Minias A. *In vitro validation of in silico-selected targets for PCR detection of genus Mycobacterium and species Mycobacterium marinum*. *Pol J Vet Sci.*, 28(4):583-595 (2025).

Sumaryczny Impact Factor: 20,54

Łączna liczba punktów MEiN: 520

### Doniesienia konferencyjne:

- **Zygała D.**, Minias A., Dziadek J. „*Evaluation of the influence of natural selection on gyrA and gyrB genes encoding DNA gyrase*”. ESM 41st Annual Congress (28-29.06.2021, online).
- **Zygała D.**, Minias A., Dziadek J. "*Molecular test to assess the usefulness of potential antituberculosis compounds against Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase*", VI Polski Kongres Genetyki (27-30.06.2022, Polska).

- **Zygała-Pytlos D.**, Podlewska S., Bojarski A., Brzostek A., Minias A., Dziadek J. *"Poszukiwanie nowych, potencjalnych związków przeciwgruźliczych"*. XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (15-17.09.2022, Polska).
- **Zygała-Pytlos D.**, Podlewska S., Bojarski A., Brzostek A., Minias A., Dziadek J. *"Potential Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase inhibitors"*. The last word belongs to microbes – Celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur (29-30.11.2022, Polska).
- **Zygała-Pytlos D.**, Brzostek A., Minias A., Dziadek J. *"Search for conserved sites in Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase"*. 43rd Annual Meeting of the European Society of Mycobacteriology (25-28.06.2023, Albania).
- **Zygała-Pytlos D.**, Minias A., Dziadek J. *"Identyfikacja sekwencji specyficznej dla gatunku Mycobacterium marinum"*. IX Ogólnopolska Konferencja Biologii Molekularnej (14-15.03.2024, Polska).
- **Zygała-Pytlos D.**, Brzostek A., Minias A., Dziadek J. *"The influence of natural selection on the DNA gyrase genes of Mycobacterium tuberculosis"* 9th International R. Weigl Conferenceplakat (27-29.06.2024, Polska).
- **Zygała-Pytlos D.**, Brzostek A., Korycka-Machała M., Dziadek J., Podlewska S., Bojarski A., Minias A. *"The influence of natural selection on the DNA gyrase genes of Mycobacterium tuberculosis"*. Tuberculosis Drug Discovery and Development / Gordon Research Conference (20-25.07.2025, Hiszpania).
- **Zygała-Pytlos D.**, Brzostek A., Korycka-Machała M., Dziadek J., Zabost A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Minias A. *"Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych do optymalizacji inhibitorówgyrazy Mycobacterium tuberculosis"*. Konferencja podsumowująca I edycję studiów podyplomowych "Bioinformatyka i biostatystyka w biologii i medycynie" (20.09.2025, Polska).
- **Zygała-Pytlos D.**, Brzostek A., Korycka-Machała M., Dziadek J., Podlewska S., Bojarski A., Zabost A., Kozińska M., Augustynowicz-Kopeć E., Minias A. *"Wpływ selekcji naturalnej na geny gyrazy DNA Mycobacterium tuberculosis"*. Krajowa Konferencja Pulmonologów i Mikrobiologów (09-10.10.2025, Polska).

## Spis treści:

Wykaz skrótów .....	10
1. Wstęp.....	14
1.1. Epidemiologia gruźlicy.....	14
1.1.1. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce.....	15
1.2. Leki wykorzystywane w terapii gruźlicy.....	16
1.2.1. Mechanizmy oporności.....	17
1.3. Topoizomerazy .....	19
1.3.1. Topoizomeraza I .....	20
1.3.1.1. Topoizomeraza I <i>M. tuberculosis</i> jako cel działania leków .....	23
1.3.2. Gyraza DNA .....	24
1.4. Gyraza DNA jako cel działania leków .....	29
1.4.1. Fluorochinolony.....	29
1.4.2. Nowe inhibitory bakteryjnych topoizomeraz .....	32
1.4.3. Aminokumaryny .....	34
1.4.4. Spiropirymidynetrony.....	35
1.4.5. Inne inhibitory gyrazy DNA <i>M. tuberculosis</i> .....	36
1.5. Mutacje w genach gyrazy DNA.....	39
1.6. Wzorcowanie ewolucyjne.....	41
2. Cel pracy.....	45
3. Materiały i metody .....	46
3.1. Analizy bioinformatyczne.....	46
3.1.1. Poszukiwanie kodonów pod wpływem działania doboru naturalnego.....	46
3.2. Poszukiwanie inhibitorów gyrazy DNA .....	47
3.2.1. Poszukiwanie inhibitorów gyrazy <i>M. tuberculosis</i> przez dokowanie molekularne .....	47
3.2.2. Poszukiwanie inhibitorów gyrazy DNA z wykorzystaniem sztucznej inteligencji ..	48
3.3. Bakteriologia.....	48
3.3.1. Szczepy bakteryjne i hodowla .....	48
3.3.1. Podłoża mikrobiologiczne i substancje dodawane do podłoży .....	50

3.3.2. Przygotowanie komórek kompetentnych.....	52
3.3.3. Transformacja .....	52
3.3.4. Ocena poziomu wrażliwości szczepów <i>M. tuberculosis</i> .....	52
3.3.5. Ocena stężenia moksyflokscyny wykazującego efekt bakteriobójczy .....	53
3.3.6. Analiza tempa wzrostu szczepów <i>M. tuberculosis</i> .....	54
3.4. Biologia molekularna.....	54
3.4.1. Syntetyczne oligonukleotydy.....	54
3.4.2. Wektory plazmidowe .....	63
3.5. Techniki wykorzystywane podczas pracy z DNA .....	69
3.5.1. Izolacja plazmidowego DNA.....	69
3.5.2. Izolacja chromosomalnego DNA.....	69
3.5.3. Amplifikacja DNA.....	69
3.5.4. Trawienie enzymami restrykcyjnymi .....	70
3.5.5. Łączenie fragmentów DNA .....	70
3.5.6. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	70
3.5.7. Elucja fragmentów DNA z żelu agarozowego .....	71
3.5.8. Sekwencjonowanie DNA.....	71
3.5.9. Konstrukcja plazmidów i szczepów <i>M. tuberculosis</i> .....	71
3.5.10. Hybrydyzacja techniką Southern blot.....	78
3.5.11. Mutageneza .....	79
3.6. Techniki wykorzystywane podczas pracy z RNA .....	80
3.6.1. Izolacja całkowitego RNA.....	80
3.6.2. Odwrotna transkrypcja.....	80
3.6.3. Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) .....	80
3.6.4. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych .....	81
3.7. Techniki wykorzystywane podczas pracy z białkami.....	81
3.7.1. Elektroforeza pionowa w żelu poliakrylamidowym.....	81
3.7.2. Pomiar stężenia białek .....	82
3.7.3. Nadprodukcja białek .....	82
3.7.4. Oczyszczanie białek przez chromatografię metalopowinowactwa.....	83
3.7.5. Oczyszczanie białek przez chromatografię żelową wykluczenia .....	84
3.7.6. Przygotowanie białka bez metki histydynowej .....	84
3.7.7. Ocena struktury III-rzędowej białek .....	85
3.8. Testy <i>in vitro</i> z wykorzystaniem rekombinowanych białek .....	85

3.8.1. Test zdolności gyrazy do superskręcania DNA .....	85
3.8.2. Test dekatencji DNA.....	87
3.8.3. Test rozszczepienia łańcucha DNA przez gyrazę.....	89
3.8.4. Test oceny tworzenia kompleksów gyrazy DNA .....	91
3.8.5. Test hydrolizy ATP.....	92
4. Wyniki .....	95
4.1. Identyfikacja kodonów mykobakteryjnej gyrazy DNA pod wpływem działania doboru naturalnego .....	95
4.2. Konstrukcja modeli genetycznych <i>M. tuberculosis</i> pozbawionych natywnych genów <i>gyrA</i> lub <i>gyrB</i> .....	98
4.3. Ocena wpływu mutacji punktowych w kodonach gyrazy będących pod doбором różnicującym na lekooporność <i>M. tuberculosis</i> .....	102
4.3.1. Uzyskanie mutantów <i>M. tuberculosis</i> noszących mutacje w <i>gyrA</i> i <i>gyrB</i> .....	102
4.3.2. Ustalenie poziomu wrażliwości na fluorochinolony .....	103
4.3.3. Określenie efektu bójczonego (MBC) moksyflokscyny na rekombinowane szczepy .....	105
4.3.4. Ustalenie poziomu oporności szczepów z mutacjami w kodonach pod doбором różnicującym na związek z grupy NBTI .....	106
4.3.5. Określenie tempa wzrostu rekombinowanych szczepów <i>M. tuberculosis</i> .....	107
4.3.6. Ocena wpływu substytucji aminokwasowych na aktywność rekombinowanych białek GyrA i GyrB.....	109
4.3.6.1. Umiejscowienie kodonów potencjalnie związanych z występowaniem lekooporności w gyrazie DNA <i>M. tuberculosis</i> .....	109
4.3.6.2. Oczyszczanie rekombinowanych białek.....	111
4.3.6.3. Ocena zdolności do superskręcania DNA plazmidowego.....	114
4.3.6.4. Ocena stabilizacji kompleksów DNA-enzym w teście cięcia DNA .....	118
4.3.6.5. Ocena dekatencji DNA .....	122
4.3.6.6. Wpływ gepotidacyny na aktywność białek rekombinowanych .....	125
4.4. Ocena wpływu mutacji punktowych w kodonach gyrazy będących pod doбором oczyszczającym na funkcjonowanie komórek <i>M. tuberculosis</i> oraz aktywność białek GyrA i GyrB .....	128
4.4.1. Wybór miejsc konserwatywnych w kodonach gyrazy <i>M. tuberculosis</i> .....	128
4.4.2. Weryfikacja wpływu substytucji w kodonach pod doбором oczyszczającym na aktywność rekombinowanych białek GyrA i GyrB.....	133
4.4.2.1. Umiejscowienie konserwatywnych kodonów w kryształach gyrazy DNA .	133
4.4.2.2. Oczyszczanie rekombinowanych białek.....	135

4.4.2.3. Ocena zdolności rekombinowanych białek z mutacjami w kodonach pod doborem oczyszczającym do superskręcania DNA.....	138
4.4.2.4. Ocena tworzenia kompleksów gyrazy DNA .....	139
4.4.2.5. Ocena zdolności do hydrolizy ATP.....	140
4.4.2.6. Aktywność enzymatyczna GyrA z substytucją E131A.....	143
4.5. Identyfikacja nowych, potencjalnych inhibitorów gyrazy.....	147
4.5.1. Wybór związków .....	147
4.5.2. Weryfikacja działania potencjalnych inhibitorów gyrazy w teście MABA ...	149
4.5.3. Weryfikacja działania potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA w testach <i>in vitro</i> .....	153
5. Dyskusja .....	157
6. Wnioski.....	170
7. Streszczenie .....	171
8. Abstrakt .....	174
9. Bibliografia.....	176
Suplement .....	188

## Wykaz skrótów

APS nadsiarczan amonu (*ang. ammonium persulfate*)

ATP adenozynotrójfosforan (*ang. adenosine triphosphate*)

BPVF pochodna bibenzimidazolu (*ang. 5-(4-butylpiperazin-1-yl)-2'-(3,4-dimethoxyphenyl)-1H,1'H-2,5'-bibenzo[d]imidazole*)

BPaLM schemat leczenia oparty na przyjmowaniu bedakiliny, pretomanidu, linezolidu, moksyflokscyny (*ang. bedaquiline, pretomanid, linezolid, moxifloxacin regimen*)

BRD domena cięcia i ponownego łączenia DNA (*ang. breakage-reunion domain*)

CFU jednostka koloniotwórcza (*ang. colony forming unit,*)

CIP ciprofloksacyna (*ang. ciprofloxacin*)

CTD domena C-końcowa (*ang. C-terminal domain*)

DCO podwójna wymiana między chromosomami homologicznymi (*ang. double cross-over*)

DLS dynamicznego rozpraszania światła (*ang. dynamic light scattering*)

DNA kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)

DSF różnicowa fluorymetria skaningowa (*ang. differential scanning fluorimetry*)

DTT ditiotreitól (*ang. dithiothreitol*)

EDTA kwas etylenodiaminotetraoctowy (*ang. ethylenediaminetetraacetic acid*)

EP wzorcowanie ewolucyjne (*ang. evolutionary patterning*)

FQ fluorochinolony (*ang. fluoroquinolones*)

GEP gepotidacyna (*ang. gepotidacin*)

GFX gatifloksacyna (*ang. gatifloxacin*)

GHKL poddomena ATP-azowa typu GHKL GyrB–Hsp90–kinaza histydynowa–MutL (*ang. gyrase B–Hsp90–histidine kinase–MutL domain*)

GWAS badanie asocjacyjne całego genomu (*ang. genome-wide association study*)

HEPES kwas 2-[4-(2-hydroksyetyl)piperazyno]etanosulfonowy (*ang. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

IC<sub>50</sub> stężenie hamujące 50% aktywności (*ang. half maximal inhibitory concentration*)

LB podłoże Luria–Bertani (*ang. lysogeny broth*)

LDH dehydrogenaza mleczanowa (*ang. lactate dehydrogenase*)

LFX lewofloksacyna (*ang. levofloxacin*)

LHS lewa strona (*ang. left-hand side*)

LPA test hybrydyzacyjny (*ang. line probe assay*)

LTBI utajone zakażenie gruźlicą (*ang. latent tuberculosis infection*)

MABA metoda mikrorozcieńczeń na 96-dołkowych płytkach z użyciem wskaźnika Alamar Blue (*ang. microplate Alamar Blue assay*)

MBC minimalne stężenie bakteriobójcze (*ang. minnum bactericidal concentration*)

MCS region wielokrotnych miejsc restrykcyjnych (*ang. multi-cloning site*)

MDR szczepy wielolekooporne (*ang. multidrug-resistant*)

MXF moksyflokscyna (*ang. moxifloxacin*)

MGI inhibitory mykobakteryjnej gyrazy DNA (*ang. mycobacterial gyrase inhibitors*)

MIC minimalne stężenie hamujące (*ang. minimum inhibitory concentration*)

MOM mykobakteryjna błona zewnętrzna (*ang. mycobacterial outer membrane*)

NBTI nowe inhibitory bakteryjnych topoizomeraz (*ang. novel bacterial topoisomerase inhibitors*)

NAD dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (*ang. nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADH zredukowana forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (*ang. reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NTM prątki niegruźlicze (*ang. non-tuberculous mycobacteria*)

OADC dodatek OADC kwas oleinowy, albumina, dekstroza, katalaza (*ang. oleic acid, albumin, dextrose, catalase supplement*)

OFX ofloksacyna (*ang. ofloxacin*)

PEP fosfoenolopirogronian (*ang. phosphoenolpyruvate*)

PK kinaza pirogronianowa (*ang. pyruvate kinase*)

PPEF pochodna bibenzimidazolu (*ang. 2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-propylpiperazin-1-yl)-1H,1'H-2,5'-bibenzo[d]imidazole*)

pre-XDR szczepy odporne (*ang. pre-extensively drug-resistant*)

PRP rodzina białek pentapeptydowych (*ang. pentapeptide repeat proteins*)

qPCR ilościowy PCR, PCR w czasie rzeczywistym (*ang. quantitative PCR*)

QRDR region determinujący oporność na chinolony (*ang. quinolone resistance-determining region*)

RHS prawa strona (*ang. right-hand side*)

RNA kwas rybonukleinowy (*ang. ribonucleic acid*)

SCO pojedyncza wymiana między chromosomami homologicznymi (*ang. single crossover*)

SDS dodecylosiarczan sodu (*ang. sodium dodecyl sulfate*)

SNP polimorfizm pojedynczych nukleotydów (*ang. single nucleotide polymorphism*)

SPT spiropirymidynetrony (*ang. spiropyrimidinetriones*)

TAE bufor Tris–octan–EDTA (*ang. Tris-acetate-EDTA buffer*)

TB gruźlica (*ang. tuberculosis*)

TEMED N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (*ang. N,N,N',N' tetramethylethylenediamine*)

TGB bufor Tris–glicyna (*ang. Tris-Glycine buffer*)

tNGS celowane sekwencjonowanie nowej generacji (*ang. targeted next-generation sequencing*)

TOPRIM domena topoizomeraza-primaza (*ang. topoisomerase–primase domain*)

WGS sekwencjonowanie całogenomowe (*ang. whole-genome sequencing*)

WHD domena helisowo-skrzydłkowa (*ang. winged helix domain*)

WHO Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)

XDR szczepy o rozszerzonej oporności (*ang. extensively drug-resistant*)

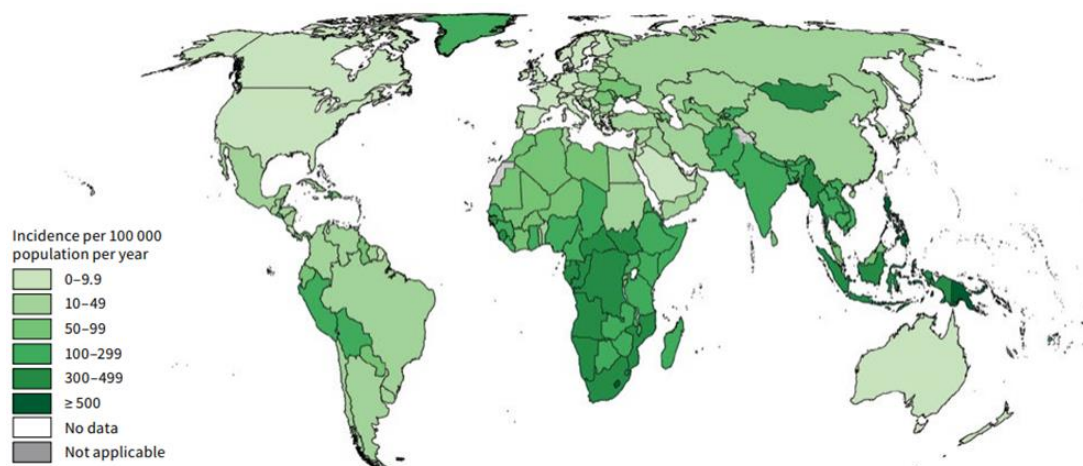
# 1. Wstęp

## 1.1 Epidemiologia gruźlicy

Gruźlica (ang. tuberculosis, TB) jest chorobą zakaźną, która towarzyszy ludzkości od starożytności. Przełomowym wydarzeniem w rozpoznawaniu gruźlicy, było odkrycie przez Roberta Kocha (1882 r.) prątka gruźlicy – *Mycobacterium tuberculosis*, czynnika etiologicznego tej choroby<sup>1</sup>. Do infekcji prątkiem gruźlicy dochodzi najczęściej drogą kropelkową, choć nie zawsze prowadzi to do aktywnej postaci choroby, a znacznie częściej mamy do czynienia ze stanem latentnym (ang. latent tuberculosis infection, LTBI), który w warunkach obniżonej odporności może prowadzić do rozwoju pełnoobjawowej choroby. Gruźlica atakuje głównie płuca, ale może obejmować również inne narządy jak na przykład: węzły chłonne, kości, opony mózgowo-rdzeniowe, skórę, serce czy narządy przewodu pokarmowego<sup>2</sup>. Najczęstszymi objawami gruźlicy są: przewlekły kaszel, krwioplucie, ból w klatce piersiowej, duszności, gorączka oraz osłabienie i utrata masy ciała<sup>3</sup>. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organisation, WHO) w 2024 roku z powodu gruźlicy zmarło 1,23 miliona osób, a szacuje się, że chorowało około 10,7 milionów (Ryc. 1.1) z czego ponad połowę, 54% stanowili mężczyźni, 35% kobiety, a 11% dzieci. Światowy współczynnik zapadalności na gruźlicę w 2024 roku wyniósł 131 na 100 000 osób. Obszarami charakteryzującymi się największą częstością występowania zakażeń były tereny Azji Południowo-Wschodniej (34% przypadków), region Zachodniego Pacyfiku (27%) oraz Afryki (25%). Ponad dwie trzecie przypadków gruźlicy pochodzi z ośmiu krajów: Indii (25%), Indonezji (10%), Filipin (6,8%), Chin (6,5%), Pakistanu (6,3%), Nigerii (4,8%), Demokratycznej Republiki Konga (3,9%) oraz Bangladeszu (3,6%)<sup>4</sup>.

Istotny problem dla zdrowia publicznego stanowi rosnąca lekooporność prątków gruźlicy. Wśród szczepów *M. tuberculosis* wyróżnia się szczepy: wielolekooporne MDR (ang. multidrug-resistant: odporne na działanie ryfampicyny i izoniazydu), o rozszerzonej oporności pre-XDR (ang. pre-extensively drug-resistant: odporne na działanie ryfampicyny, izoniazydu i dowolnego fluorochinolonu) i XDR (ang. extensively drug-resistant: niewrażliwe względem ryfampicyny, izoniazydu, fluorochinolonów, bedakiliny lub linezolidu). W 2023 odnotowano około 1,5 miliona przypadków, gdzie zidentyfikowano oporność na izoniazyd, a około 390 000 stanowiły szczepy MDR. Ponad połowa wielolekoopornych szczepów *M. tuberculosis* pochodzi

z Indii (32%), Chin (7,1%), Filipin (7,1%) i Rosji (6,7%)<sup>4</sup>. Lekooporność prątków stanowi duże utrudnienie w leczeniu i zapobieganiu nowym zakażeniom. Z tego względu zasadnym jest poszukiwanie nowych leków, które charakteryzowałyby się większą skutecznością i mniejszą toksycznością.



Rycina 1.1 Mapa świata przedstawiająca liczbę nowych zachorowań na gruźlicę w przeliczeniu na 100 000 mieszkańców w 2024 roku. Pobrano z „Global tuberculosis report 2025” WHO<sup>4</sup>, licencja CC BY-NCSA 3.0 IGO.

Strategia End TB to globalny plan Światowej Organizacji Zdrowia, którego celem jest zakończenie epidemii gruźlicy poprzez zmniejszenie liczby zgonów i zachorowań oraz zwiększenie dostępu do diagnostyki i leczenia na całym świecie. Jednym z założeń prowadzonej strategii było zmniejszenie przypadków gruźlicy o 50% do 2025 roku, a obecnie spadek ten wynosi 12%. Kolejnym celem End TB była redukcja liczby zgonów o 75%, z obecnym wynikiem 29%, oraz eliminacja problemów związanych z kosztami leczenia<sup>4</sup>.

### 1.1.1 Sytuacja epidemiologiczna w Polsce

W Polsce podobnie jak w innych krajach Unii Europejskich w ostatnich latach obserwuje się powolny spadek zapadalności na gruźlicę, choć trend ten został zaburzony w 2020 i 2021 roku podczas pandemii COVID-19, ze względu na utrudnioną diagnostykę i leczenie<sup>5</sup>. W 2024 roku w Polsce odnotowano 3737 nowych przypadków gruźlicy, a zarejestrowano 4236 wszystkich postaci gruźlicy. Najwięcej zachorowań zarejestrowano u mężczyzn (74%), a najczęstszą postacią była gruźlica płuc (ponad

96%). Odnotowano 376 nowych przypadków gruźlicy u cudzoziemców, z czego największą grupę stanowiły osoby z Ukrainy (229), Indii (25) i Gruzji (13). Współczynnik zachorowalności w 2024 roku wyniósł 11,3 na 100 000 mieszkańców i był niższy o 4,2% niż w 2023 roku. Najwięcej przypadków gruźlicy odnotowano w województwie śląskim (718), mazowieckim (601), dolnośląskim (386), lubelskim (328) oraz małopolskim (307). Gruźlicę wielolekooporną (MDR-TB) rozpoznano u 106 osób, ponadto zidentyfikowano 6 szczepów opornych wyłącznie na ryfampicynę i 80 na izoniazyd. W 2023 roku w Polsce z powodu gruźlicy zmarły 483 osoby, 384 mężczyźni i 99 kobiet, a największą grupę stanowiły osoby w wieku 45-64 lat<sup>5</sup>.

## 1.2 Leki wykorzystywane w terapii gruźlicy

Wśród obecnie stosowanych leków przeciwgruźliczych można wyróżnić leki pierwszej linii wykorzystywane w leczeniu gruźlicy lekowrażliwej oraz leki stosowane w leczeniu gruźlicy typu MDR, sklasyfikowane na podstawie ich skuteczności i bezpieczeństwa stosowania. Do leków grupy A stosowanych w leczeniu MDR-TB, o najwyższej skuteczności należą: lewofloksacyna, moksyflokscyna, bedakilina, linezolid, pretomanid. Grupa B, czyli leki uzupełniające to klofazymina, cykloseryna i terizydon, a grupa C to leki rezerwowe takie jak: etambutol, delamanid, pirazynamid, amikacyna, streptomycyna, etionamid, pretonamid, kwas p-aminosalicylowy, meropenem, imipenem-cylastatyna<sup>6,7</sup>.

Zastosowanie odpowiedniego leczenia ma za zadanie nie tylko eliminację prątków, ale również musi zapobiegać rozwojowi lekooporności. W leczeniu gruźlicy wrażliwej na leki u dorosłych i młodzieży w wieku powyżej 12 lat, Światowa Organizacja Zdrowia zaleca nowy, skrócony do 4 miesięcy schemat leczenia i stosowanie izoniazydu, ryfapentyny, pirazynamidu i moksyflokscyny. Natomiast standardem nadal pozostaje 6-miesięczny schemat leczenia z fazą intensywną (2 miesiące), gdzie przyjmowany jest izoniazyd, ryfampicyna, pirazynamid oraz etambutol, a następnie w fazie kontynuacji (4 miesiące) izoniazyd i ryfampicyna<sup>7</sup>. W Polsce podobnie jak w innych krajach europejskich, ze względu na brak dostępności ryfapentyny stosuje się standardowy, 6-miesięczny schemat leczenia<sup>8</sup>. Dla pacjentów powyżej 14 roku życia z gruźlicą oporną MDR lub pre-XDR, WHO warunkowo rekomenduje nowoczesne, krótkie, 6-miesięczne schematy leczenia BPaLM (bedakilina, pretomanid, linezolid, moksyflokscyna) lub

BPaL (bedakilina, pretomanid, linezolid)<sup>7,9</sup>. Z kolei schematy 9-miesięczne lub dłuższe przeznaczone są dla osób z nietolerancją na leki ze schematu BPaL(M) lub z XDR. W tym przypadku w pierwszej fazie (4 miesiące, lub 6 miesięcy w przypadku dodatniej bakterioskopii) przyjmuje się bedakilinę (6 miesięcy), lewofloksacynę lub moksyfloksacynę, etambutol, etionamid lub linezolid, izoniazyd, pirazynamid oraz klofazyminę. W fazie kontynuacji leczenia pacjenci przyjmują przez 5 miesięcy lewofloksacynę lub moksyfloksacynę, klofazyminę, etambutol oraz pirazynamid<sup>7</sup>.

### 1.2.1 Mechanizmy oporności

Mechanizmy oporności na leki u *M. tuberculosis* można podzielić na naturalne - wynikające z budowy komórki bakteryjnej oraz nabyte, które są spowodowane pojawianiem się mutacji punktowych. Głównym czynnikiem naturalnej bariery prątków jest ich ściana komórkowa. Zbudowana jest z peptydoglikanu, arabinogalaktanu i przyłączonych kwasów mykolowych, które tworzą specyficzną warstwę nazywaną mykobakteryjną błoną zewnętrzną (ang. mycobacterial outer membrane, MOM). Bardziej na zewnątrz wyróżniamy warstwę wolnych lipidów, gdzie znajdują się glikolipidy związane z wirulencją, jak na przykład dimykocerozyniany ftiocerolu oraz węglowodany:  $\alpha$ -D-glukan i D-arabino-D-mannan. Taka osłona stanowi barierę dla wielu antybiotyków, które nie są w stanie skutecznie przenikać do wnętrza komórki<sup>10</sup>. Kolejnym mechanizmem oporności naturalnej są bakteryjne pompy wyrzutu (ang. efflux pumps). U szczepów *M. tuberculosis* zidentyfikowano pompy z rodziny ABC (ang. ATP Binding Cassette Transporters) regulowane przez hydrolizę ATP; MFS (ang. Major Facilitator Superfamily Transporters) regulowane przez zmiany konformacyjne; MATE (ang. Multidrug And Toxic compound Extrusion Transporters), które nie zostały dobrze scharakteryzowane u *M. tuberculosis*, RND (ang. Resistance Nodulation Cell Division Transporters) oraz SMR (ang. Small Multidrug Resistance Transporters), na których ekspresję wpływa obecność antybiotyków lub innych substancji w komórce<sup>10-12</sup>. Ponadto istnieją mechanizmy polegające na zmianach w celach molekularnych leków oraz szlakach metabolicznych *M. tuberculosis*. Mykobakteryjna metylotransferaza Erm(37) może modyfikować miejsca wiązania makrolidów przez metylacje nukleotydów 23S rRNA<sup>10</sup>. Prątki wytwarzają również  $\beta$ -laktamazę, BlaC, która hydrolizuje  $\beta$ -laktamy, co skutkuje brakiem skuteczności związków z tej grupy. Inny mechanizm opiera się na

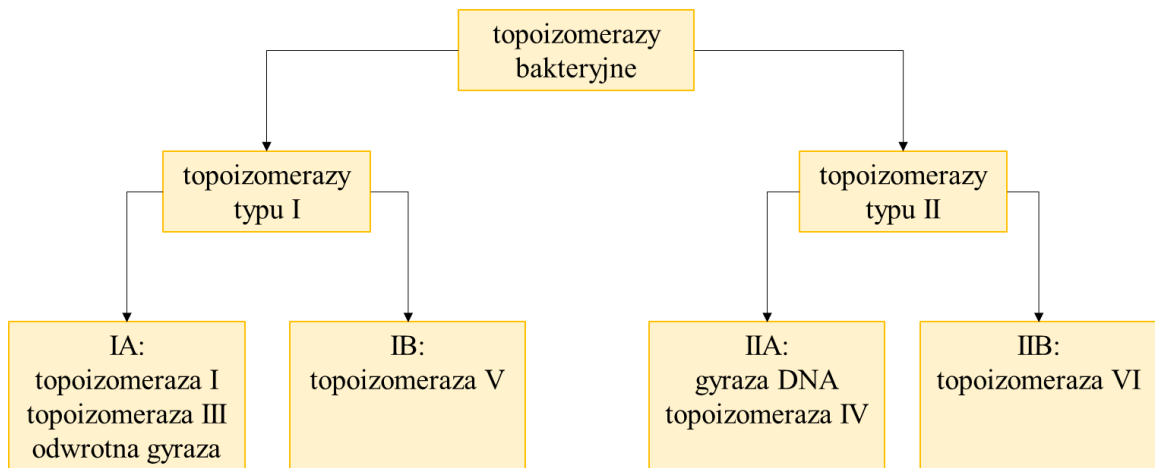
ekspresji oraz nadekspresji, w wyniku mutacji, białka Eis (ang. enhanced intracellular survival protein) *M. tuberculosis*, które posiada zdolność do acetylacji związków z grupy aminoglikozydów oraz kapreomycyn przez co dochodzi do ich inaktywacji<sup>10,13</sup>.

Z kolei oporność nabyta jest wynikiem mutacji w chromosomalnym DNA w genach będących celem działania leków, biorących udział w ich aktywacji lub regulujących wpływ substancji z komórki. Ten rodzaj oporności pojawia się w wyniku mutacji spontanicznych po ekspozycji na dane leki przeciwgruźlicze. Wśród tych leków można wyróżnić inhibitory syntezy ściany komórkowej: izoniazyd, etionamid, etambutol, cykloseryna, meropenem, imipenem oraz terizydon, a oporność na te związki jest związana z pojawianiem się mutacji m.in. w genach *inhA*, *katG*, *ahpC*, *etaA*, *ethA*, *embA*, *embB*, *embC*, *alrA*, *blaC*. Kolejna grupa leków - ryfamycyny (ryfampicyna, ryfapentyna, ryfabutyna) hamuje proces transkrypcji przez wiązanie do podjednostki  $\beta$  polimerazy RNA, a lekooporność warunkowana jest przez mutacje pojawiające się w genie *rpoB*. W przypadku inhibitorów translacji, takich jak: streptomycyna, amikacyna i linezolid ich długotrwałe i niewłaściwe stosowanie może prowadzić do akumulacji mutacji w genach *rpsL*, *rrs*, *rplC* odpowiadających za zwiększenie oporności. Za zaburzenia funkcji błony komórkowej przez hamowanie syntetazy ATP odpowiada bedakilina, a genem, w którym następuje akumulacja mutacji odpowiadających za rozwój oporności jest *atpE*<sup>13,14</sup>. Pirazynamid to prolek aktywowany przez enzym pirazynamidazę kodowaną przez gen *pncA*, w którym mutacje są główną przyczyną oporności na ten lek. Jednakże w szczepach lekoopornych zaobserwowano także obecność mutacji w genach *rpsA*, *panD*, *clpC1* czy genach kodujących pompy wielolekowej oporności. Lek ten działa wielotorowo, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, zakłócenie metabolizmu NAD, translacji oraz destabilizację błony komórkowej<sup>15,16</sup>. Innymi prolekami są: delamanid oraz pretonamid, które również wpływają na zahamowanie syntezy ściany komórkowej, a ponadto zaburzają oddychanie komórkowe, przez generowanie reaktywnych form azotu. Genami, w których dochodzi do akumulacji mutacji związanych z pojawianiem się oporności na oba leki są: *ddn*, *fbiA*, *fbiB*, *fbiC* oraz *fgdI*<sup>17,18</sup>. W postaci proleku podawany jest również wspomniany wcześniej izoniazyd, który przekształcany jest do formy aktywnej, kompleksu z NAD przez katalazę/peroksydazę (KatG) i wiąże się z NAD-zależną reduktazą enoilo-ACP (InhA), biorącą udział w szlaku biosyntezy kwasów mykoloowych<sup>19</sup>. Klofazymina posiada kilka mechanizmów działania przez co nie ma specyficznego markera oporności. Może ona wpływać na destabilizację błony

komórkowej, oddychanie komórkowe oraz transport jonów<sup>20</sup>. Kwas p-aminosalicylowy wpływa na zaburzenie syntezy nukleotydów, a mutacje w genach *thyA*, *folC* przyczyniają się do braku wrażliwości na ten związek. Z kolei oporność na fluorochinolony pojawia się w wyniku mutacji w genach *gyrA* oraz *gyrB* kodujących podjednostki gyrazy DNA, należącej do topoizomeraz uczestniczących w procesach metabolicznych kwasów nukleinowych<sup>13,14</sup>.

### 1.3 Topoizomerazy

Topoizomerazy są enzymami uczestniczącymi w regulacji topologii DNA. Ze względu na różnice w strukturze i mechanizmie działania wyróżniono dwie grupy topoizomeraz: typu I oraz typu II (Ryc. 1.2). Enzymy te uczestniczą w wielu procesach metabolicznych DNA, takich jak: replikacja, transkrypcja, rekombinacja homologiczna, naprawa oraz dekatencja DNA. Podczas replikacji przesuujące się przed widełkami replikacyjnymi nici DNA, które są rozplatane przez helikazę, tworzą napięcia torsyjne przez gromadzenie się dodatknych superskrętów. Podczas transkrypcji, przed kompleksem transkrypcyjnym powstają dodatnie superskręty, a za nim ujemne<sup>21</sup>. Dodatkową trudność stanowią kolizje pomiędzy procesami transkrypcji i replikacji, gdzie może dochodzić do powstawania hybryd RNA-DNA, R-pętli, co utrudnia ruch widełek replikacyjnych i może prowadzić do uszkodzenia pojedynczych nici DNA. Działanie topoizomeraz umożliwia prawidłowe zachodzenie replikacji i transkrypcji poprzez niwelowanie nadmiernych skrętów DNA<sup>22</sup>. Ważnym procesem w metabolizmie DNA jest rekombinacja homologiczna, która odpowiada nie tylko za zmienność genomów, ale także uczestniczy w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA. Podczas naprawy i wymiany nici DNA tworzone są struktury Holidaya, a podczas migracji nici powstają naprężenia torsyjne DNA, które są niwelowane przez topoizomerazy<sup>23</sup>. Topoizomerazy odpowiadają również za dekatencję DNA, czyli rozdzielenie splecionych cząsteczek DNA chromosomalnego, co jest niezbędne do prawidłowego rozdziału materiału genetycznego podczas podziału komórkowego<sup>21</sup>.

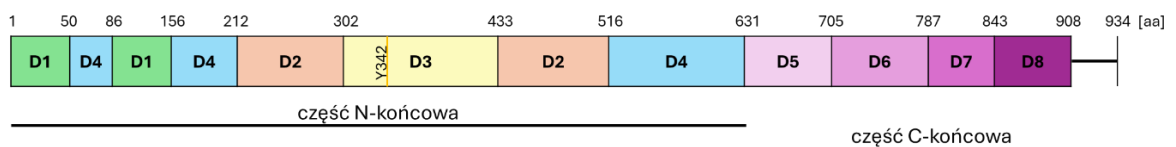


Rycina 1.2 Podział bakteryjnych topoizomeraz<sup>21</sup>.

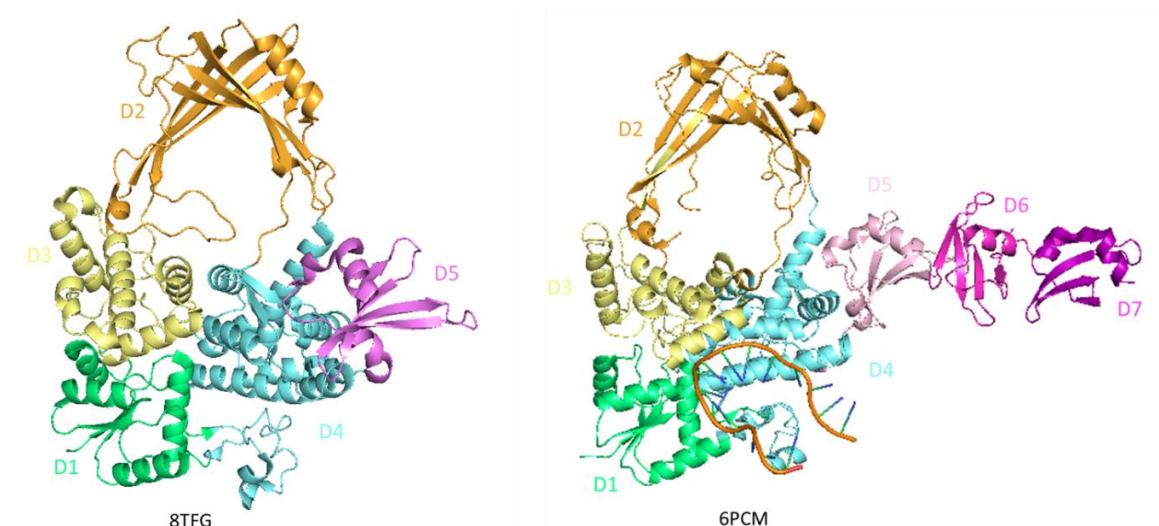
U *M. tuberculosis* zidentyfikowano tak zwany „minimalny zestaw topoizomeraz” w skład, którego wchodzi jedna topoizomeraza typu I – topoizomeraza I (TopA) oraz jedna typu II – gyraza DNA (GyrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>). Oba enzymy są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania patogenu<sup>24</sup>.

### 1.3.1 Topoizomeraza I

Topoizomeraza I (TopA) *M. tuberculosis* jest monomerem kodowanym przez gen *topA* (Rv3646c). Zbudowana jest z 934 aminokwasów, które tworzą cztery domeny N-terminalne: D1, D2, D3, D4 oraz region C-terminalny (CTD) w skład, którego wchodzi domeny D5, D6, D7 i D8 (Ryc.1.3, Ryc.1.4). Masa cząsteczkowa białka wynosi 102 kDa<sup>24-26</sup>.

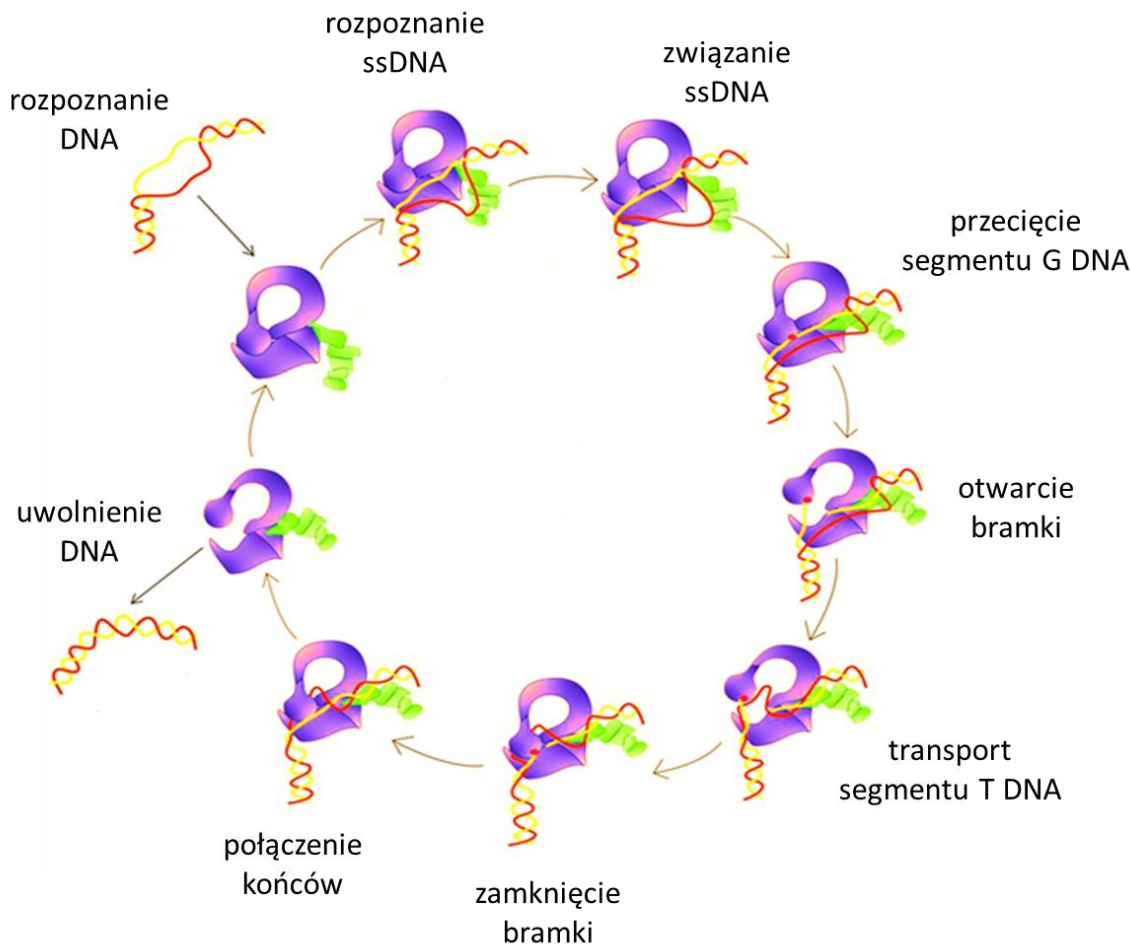


Rycina 1.3 Budowa domenowa topoizomerazy I *M. tuberculosis* z podziałem na część N-końcową oraz C-końcową i z zaznaczeniem katalitycznej reszty tyrozynowej Y342.



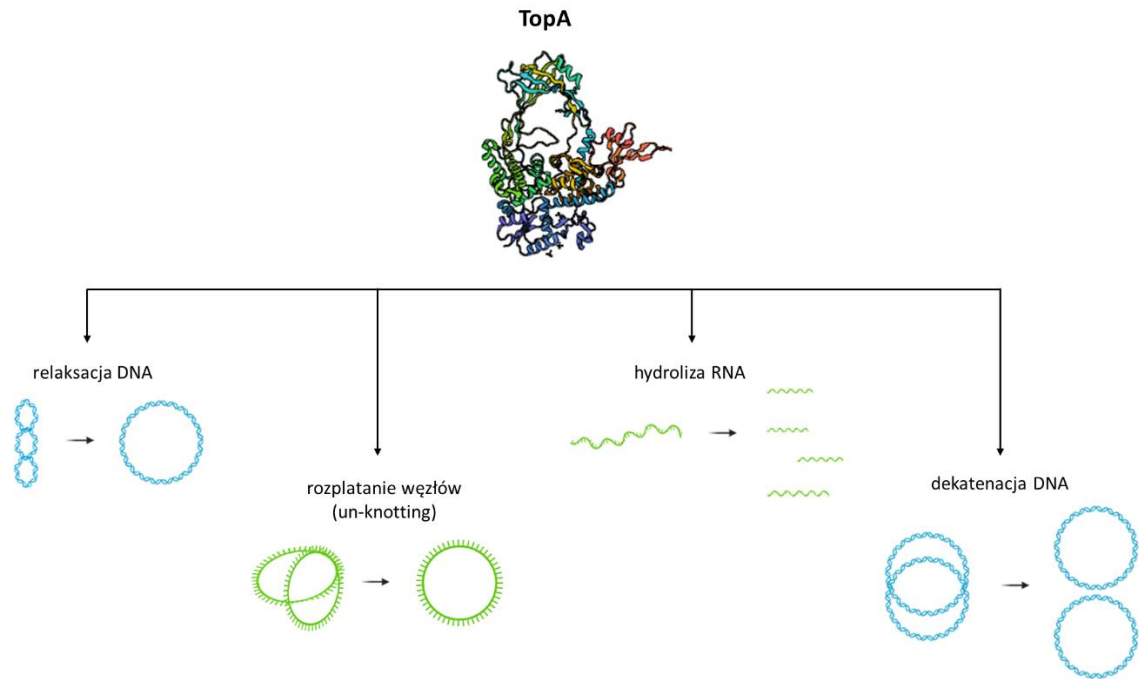
Rycina 1.4. Schemat struktury przestrzennej topoizomerazy I *M. tuberculosis*: domeny D1-D5 (kryształ 8TFG) oraz *M. smegmatis*: domeny D1-D7 z ssDNA (kryształ 6PCM). Kryształy pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL. Topoizomeraza I z *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* mają 82% identyczności sekwencji aminokwasowej<sup>28</sup>.

Enzym ten katalizuje relaksację DNA, niezależnie od obecności i hydrolizy ATP. Reakcja zachodzi przez rozpoznanie segmentu G nici DNA, następnie reszta tyrozynowa w centrum aktywnym enzymu wiąże się kowalencyjnie z końcem 5' DNA przez wiązanie fosfotyrozynowe. W ten sposób w obecności jonów magnezu powstaje pośredni kompleks białko-DNA, gdzie jedna z nici DNA zostaje przecięta. Następnie przez zmiany konformacyjne białka dochodzi do rozsunienia przeciętych końców, dzięki czemu możliwe jest przejście drugiej nici - segmentu T DNA. Na tym etapie dochodzi do zmiany liczby skrętów DNA i jego relaksacji. Dalej w reakcji odwrotnej transestryfikacji pęknięte końce DNA są ponownie łączone, a DNA jest uwalniane lub zachodzi kolejny cykl reakcyjny (Ryc. 1.5). W każdym cyklu eliminowany jest jeden ujemny superskręt DNA chromosomalnego<sup>29</sup>.



Rycina 1.5 Schemat relaksacji DNA przez topoizomerazę I *M. tuberculosis* na podstawie Dasgupta i in. 2020, licencja CC BY 4.0<sup>30</sup>

U *M. tuberculosis* topoizomeraza I, poza główną funkcją polegającą na relaksacji DNA, posiada również aktywność topoizomerazy RNA, a więc zdolność do hydrolizy RNA, rozplatania hybryd RNA-DNA, RNA-RNA oraz węzłów RNA<sup>31</sup>. Nie zidentyfikowano u *M. tuberculosis* topoizomerazy IV odpowiedzialnej za dekatencję DNA, czyli rozplątywania cząsteczek DNA splecionych po replikacji. U prątka gruźlicy funkcję tę pełni głównie gyraza DNA, ale aktywność dekatencji posiada również topoizomeraza I (Ryc. 1.6)<sup>32</sup>.



Rycina 1.6 Schemat przedstawiający funkcje topoiizomerazy I *M. tuberculosis* (TopA)<sup>33</sup>. Opracowano z wykorzystaniem programu Bio-Render.

### 1.3.1.1 Topoiizomeraza I *M. tuberculosis* jako cel działania leków

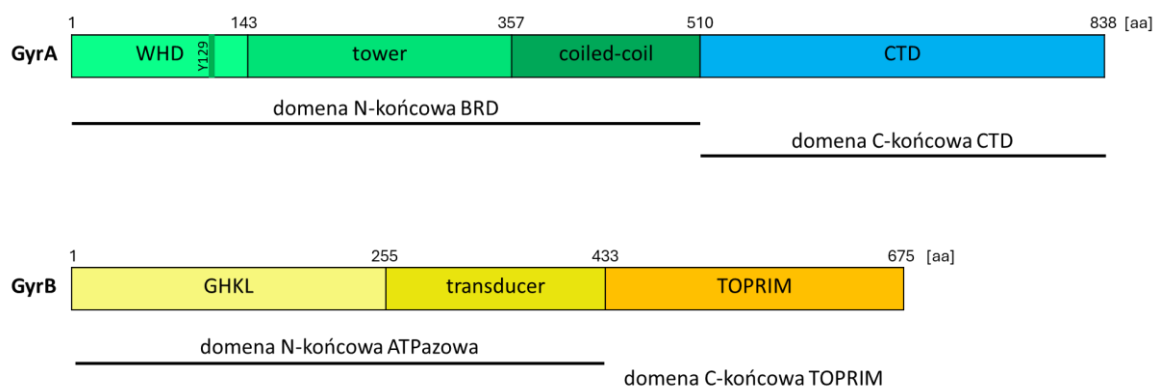
Z uwagi na fakt, że topoiizomeraza I (TopA) *M. tuberculosis* jest enzymem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej, białko to stanowi atrakcyjny cel działania dla poszukiwania nowych leków przeciwgruźliczych. Obecne badania *in vitro* oraz *in silico* wskazują na kluczowe sekwencje TopA, które mogą być miejscem docelowym dla kilku grup inhibitorów o różnych mechanizmach działania<sup>28,29</sup>. Antybiotyki z grupy kumaryn, jak chryzomycyna A, mają zdolność do hamowania relaksacji DNA prawdopodobnie przez wiązanie się ze specyficznymi sekwencjami DNA, jak i topoiizomerazą I. Wykazano, że związek ten działa synergistycznie z innymi lekami przeciwgruźliczymi i może również hamować aktywność gyrazy DNA<sup>34</sup>. Związki srebra (III) takie jak makrocykle oraz chelaty tworzą nową grupę inhibitorów topoiizomerazy I, działającą selektywnie względem tej grupy enzymów. Mechanizm działania związków srebra prawdopodobnie opiera się na zahamowaniu wiązania lub etapu cięcia nici DNA<sup>35</sup>. Pochodne fluorochinofenoksazynów również mają zdolność do hamowania aktywności topoiizomeraz *M. tuberculosis*. Chociaż wiadomo, że związki te interkalują do DNA, to mechanizm zahamowania aktywności enzymów nie jest do końca

znany<sup>36</sup>. Związki z grupy imidazopirydyny, o właściwościach antydepresyjnych, jak imipramina oraz nor-klomipramina wiążą się do TopA w miejscu wiązania jonów magnezu, niezbędnych podczas transestryfikacji, przez co prowadzą do zatrzymania podstawowych funkcji enzymu<sup>37</sup>. W podobny sposób działają alkaloidy, pochodne boldyny: seconeolitsyna oraz N-metylo-seconeolitsyna<sup>38</sup>. Pochodne bibenzimidazoli: PPEF oraz BPVF, hamują wzrost *M. tuberculosis*, a ich działanie opiera się na przyłączaniu do kompleksu TopA z DNA w miejscu wiązania dwóch cząsteczek i stabilizacji kompleksu, co skutkuje zahamowaniem aktywności enzymu<sup>39</sup>. Małe cząsteczki oparte na szkielecie poliaminowym, mogą być inhibitorami katalitycznymi enzymu, ale ich dokładny mechanizm działania nie jest znany<sup>40</sup>. Inną grupę inhibitorów stanowią przeciwciała monoklonalne jak 1E4F5, 2F3G4, 1D9D10, hamujące różne etapy relaksacji: łączenie z DNA, cięcie DNA, pasaż nici DNA przez pęknięcie czy uwalnianie DNA. Przeciwciała monoklonalne stanowią punkt wyjścia dla projektowania inhibitorów peptydowych<sup>29,41</sup>. Kolejnym inhibitorem TopA jest białko MazF4 (Rv1495) *M. tuberculosis*, należące do systemu toksyna-antytoksyna. MazF4 jest endorybonukleazą, pełniąc funkcje toksyny, odpowiedzialną za rozcinanie specyficznych sekwencji jednoniciowego RNA. Białko to ma zdolność do wiązania się z topoisomerazą I i hamowania rozluźniania DNA. Z drugiej strony część C-końcowa TopA może wiązać się z MazF4 i osłabiać jego zdolność do cięcia RNA. W ten sposób enzymy te wzajemnie się regulują, a dwie konserwatywne lizyny topoisomerazy, kluczowe dla interakcji TopA-MazF4, mogą stanowić dobre miejsce wiązania dla nowych związków przeciwwgruźliczych<sup>42</sup>. Duża ilość grup związków chemicznych i cząsteczek zdolnych do hamowania aktywności topoisomerazy I, zachęcają do poszukiwania nowych, skutecznych leków przeciwwgruźliczych ukierunkowanych na ten cel molekularny.

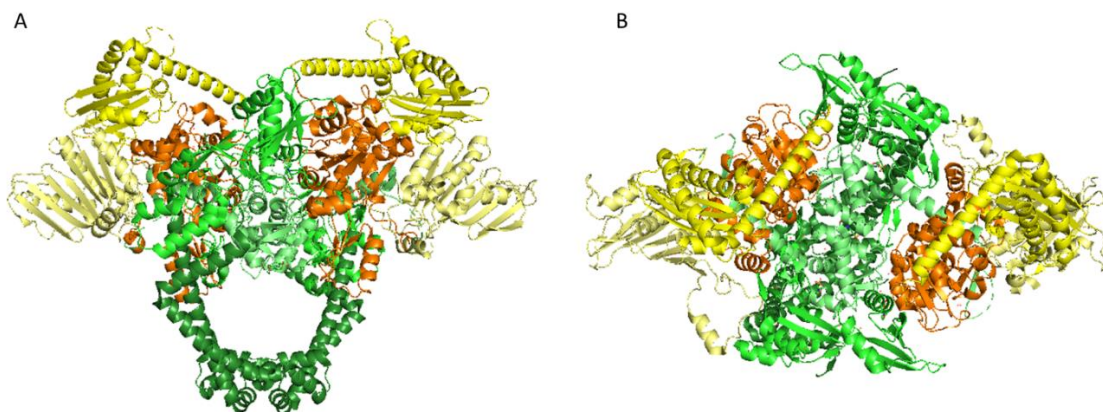
### 1.3.2 Gyraza DNA

Gyraza DNA *M. tuberculosis* (GyrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) należy do topoisomeraż typu IIA. Enzym ten jest heterotetramerem, zbudowanym z dwóch podjednostek GyrA oraz dwóch podjednostek GyrB, kodowanych odpowiednio przez geny *gyrA* (Rv0006) oraz *gyrB* (Rv0005). Gen *gyrA* koduje białko GyrA składające się z 838 aminokwasów, o masie cząsteczkowej 92 kDa<sup>25,26</sup>. Podjednostka A gyrazy składa się z domeny N-końcowej BRD

(ang. breakage-reunion domain) uczestniczącej w cięciu i ponownym łączeniu nici segmentu G DNA oraz domeny C-końcowej karboksyterminalnej, CTD (ang. C-terminal domain) biorącej udział w wiązaniu i owijaniu DNA. W obrębie domeny BRD znajdują się trzy poddomeny: WHD (ang. winged helix domain) z katalityczną tyrozyną, tower, oraz superhelikalna (ang. coiled-coil subdomain) (Ryc. 1.7, Ryc. 1.8)<sup>43,44</sup>. Gen *gyrB* koduje białko GyrB zbudowane z 675 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 74 kDa<sup>25,26</sup>. W podjednostce B znajduje się N-końcowa domena – ATPazowa, która składa się z poddomeny GHKL (ang. gyrase B–Hsp90–histidine kinase–MutL) wiążącej ATP oraz poddomeny transducer (ang. transducer domain) odpowiedzialnej za przekazywanie sygnału i zmiany konformacyjne białka. Dodatkowo w obrębie poddomeny GHKL znajdują się krótki odcinek, pętla C (ang. C-loop), który odpowiada za oddziaływanie z C-końcową domeną TOPRIM (ang. TOPoisomerase–PRIMase domain) oraz podjednostką A gyrazy i wykazuje kluczową rolę podczas dimeryzacji domeny ATPazowej. Udowodniono, że C-końcowa domena TOPRIM uczestniczy w koordynacji jonu magnezu w otoczeniu reszty tyrozynowej w domenie WHD przez aminokwasy: D526, D528, E498 oraz interakcje podjednostki GyrB z GyrA (Ryc. 1.7, Ryc. 1.8)<sup>33,43–46</sup>.

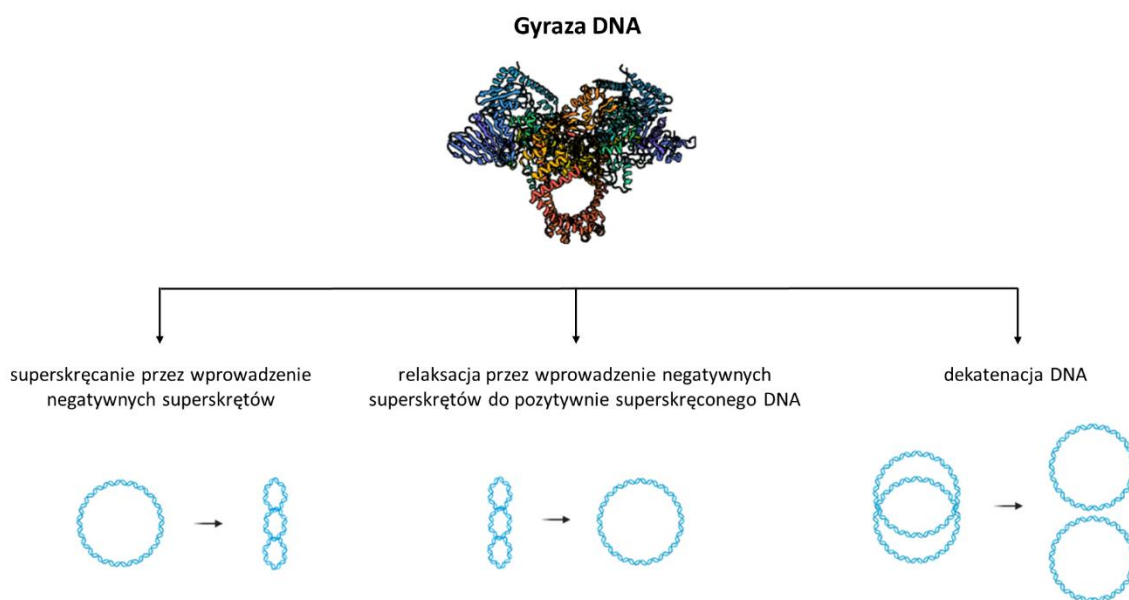


Rycina 1.7 Budowa domenowa i poddomenowa podjednostki A i B gyrazy DNA *M. tuberculosis* z wyszczególnioną katalityczną resztą tyrozynową Y129<sup>33</sup>.



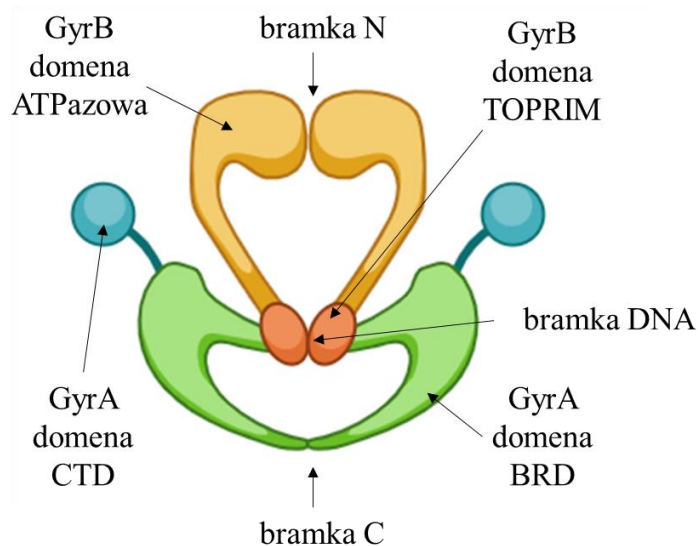
Rycina 1.8 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *M. tuberculosis* w konformacji otwartej (kryształ 6GAV - brak domeny CTD GyrA). Kryształ 6GAV (A, B) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

Kompleks gyrazy DNA odpowiada za regulację topologii DNA przez wprowadzanie ujemnych superskrętów w DNA z wykorzystaniem energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Ponadto gyrafa DNA *M. tuberculosis*, jako jedyna topoizomeraza typu II, posiada również zdolność do dekatencji DNA (Ryc. 1.9)<sup>33</sup>.



Rycina 1.9 Funkcje gyrazy DNA *M. tuberculosis*<sup>33</sup>. Opracowano z wykorzystaniem programu Bio-Render.

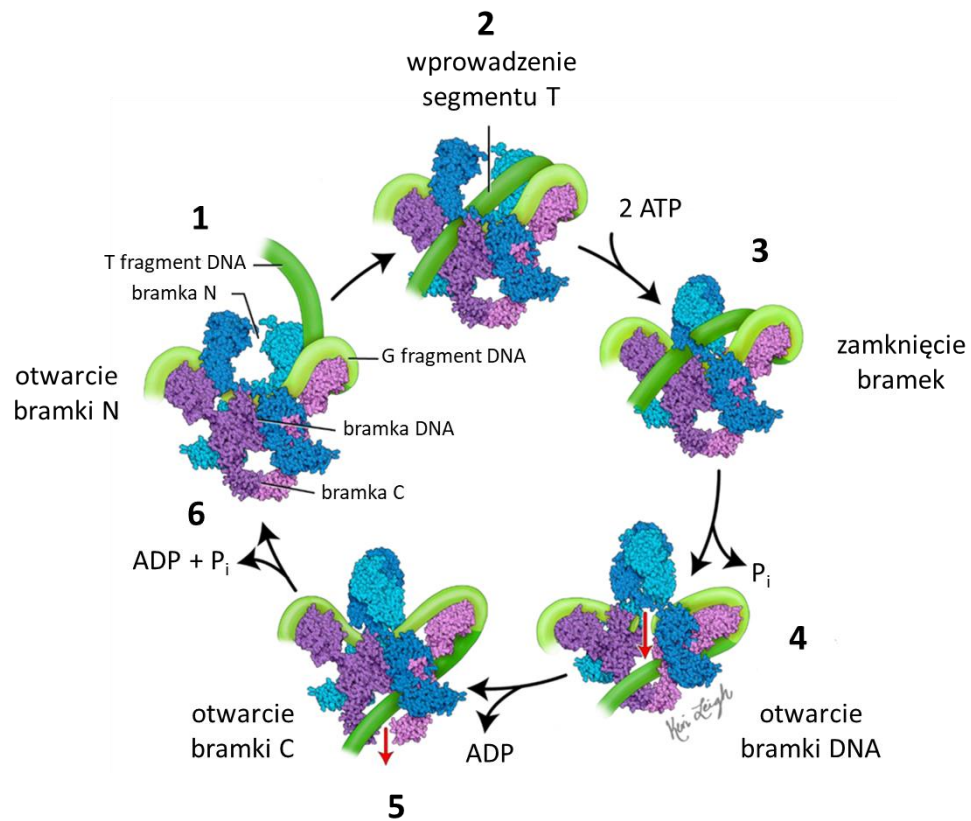
W strukturze heterotetrameru gyrazy wyróżnia się bramki: N, DNA i C, które uczestniczą odpowiednio w wiązaniu i hydrolizie ATP, cięciu, przejściu i ponownym łączeniu DNA (Ryc. 1.10). Rdzeń katalityczny gyrazy zbudowany jest z domeny TOPRIM GyrB oraz domeny BRD podjednostki GyrA<sup>44</sup>.



Rycina 1.10 Schemat struktury gyrazy DNA *M. tuberculosis*. Opracowano z wykorzystaniem programu BioRender.

Mechanizm działania gyrazy opiera się na prawoskrętnym owinięciu DNA wokół C-terminalnej domeny GyrA. Kluczowymi aminokwasami uczestniczącymi w wiązaniu DNA są: Y577, D669, R691, R745 oraz G729. W centrum aktywnym pomiędzy tym fragmentem DNA, nazywanym segmentem G, a resztą tyrozynową (Y129) znajdującą się w domenie BRD GyrA, zostaje wytworzone wiązanie 5'-fosfotyrozynowe. W ten sposób tworzone jest pęknięcie nici DNA, a każda z dwóch podjednostek A przecina jedną nić. Sam atak reszty tyrozynowej na grupę fosforylową DNA jest wywołany polaryzacją aminokwasu przez jon magnezu, który z kolei ulega deprotonacji przez histydyny GyrA (kodon 78, 80). Pęknięcie DNA jest przesunięte pomiędzy nićmi DNA o cztery nukleotydy. Dalszy fragment DNA nazywany segmentem T zostaje przetransportowany przez bramkę N gyrazy DNA, tworzoną przez domenę ATPazową. Po związaniu ATP bramka N zostaje zamknięta, a po hydrolizie jednej cząsteczki dochodzi do przecięcia segmentu G DNA, otwarcia bramki DNA i transportu fragmentu T. Segment T DNA zostaje przetransportowany przez dwuniciowe pęknięcie segmentu G, a następnie przy hydrolizie drugiej cząsteczki ATP i uwolnieniu ADP, bramka C zostaje otwarta, a DNA uwolniony. W ten sposób do cząsteczki DNA wprowadzane są dwa ujemne superskręty.

W kolejnym etapie dwuniciowe pęknięcia segmentu G DNA są ponownie łączone. Następuje uwolnienie drugiej cząsteczki ADP w celu powrotu kompleksu do stanu wyjściowego i otwarcia bramki N. Segment G DNA zostaje uwolniony lub dochodzi do kolejnego cyklu reakcyjnego (Ryc. 1.11)<sup>43,47-49</sup>.



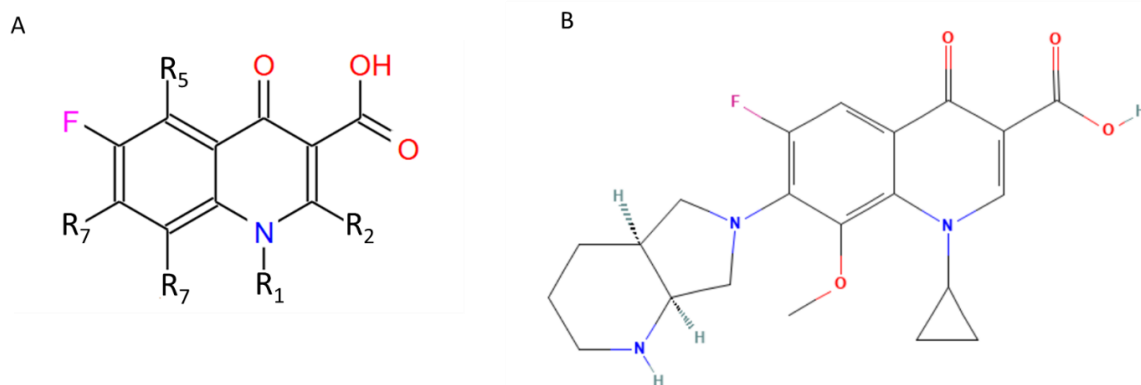
Rycina 1.11 Mechanizm działania gyrazy DNA (GyrA – fioletowy, GyrB – niebieski) *M. tuberculosis* z wyszczególnionymi zmianami konformacyjnymi białka, na podstawie Spencer i Panda 2023, licencja CC BY 4.0<sup>43</sup>. 1) Segment G DNA (jasnozielony) przyłącza się do domeny CTD GyrA; 2) segment T DNA (ciemnozielony) przechodzi przez bramkę N gyrazy; 3) dwie cząsteczki ATP przyłączają się do GyrB, następuje zamknięcie bramki N; 4) następuje przecięcie segmentu G DNA, otwarcie bramki DNA i przejście segmentu T DNA, ten etap wymaga hydrolizy jednej cząsteczki ATP; 5) bramka C zostaje otwarta, a segment T DNA uwolniony, następuje uwolnienie ADP i hydroliza drugiej cząsteczki ATP; 6) druga cząsteczka ADP jest uwalniana, następuje zamknięcie bramki C, a otwarcie bramki N, enzym wraca do konformacji początkowej.

## 1.4 Gyraza DNA jako cel działania leków

Gyraza DNA jest jedyną topoisomerasą typu II u *M. tuberculosis*, jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej i stanowi cel działania kilku grup leków przeciwgruźliczych. Co istotne, nie zidentyfikowano gyrazy DNA w komórkach ssaków, a ludzka topizomeraza typu II jest na tyle odmienna od prokariotycznych, że możliwe jest bezpieczne wykorzystanie inhibitorów gyrazy w leczeniu ludzi. Enzym ten jest molekularną tarczą działania fluorochinolonów, jednej z głównych grup leków stosowanych w leczeniu gruźlicy. Obecnie dostępne są również inne związki oraz cząsteczki będące inhibitorami gyrazy DNA, które zostały opisane poniżej<sup>50,51</sup>.

### 1.4.1 Fluorochinolony

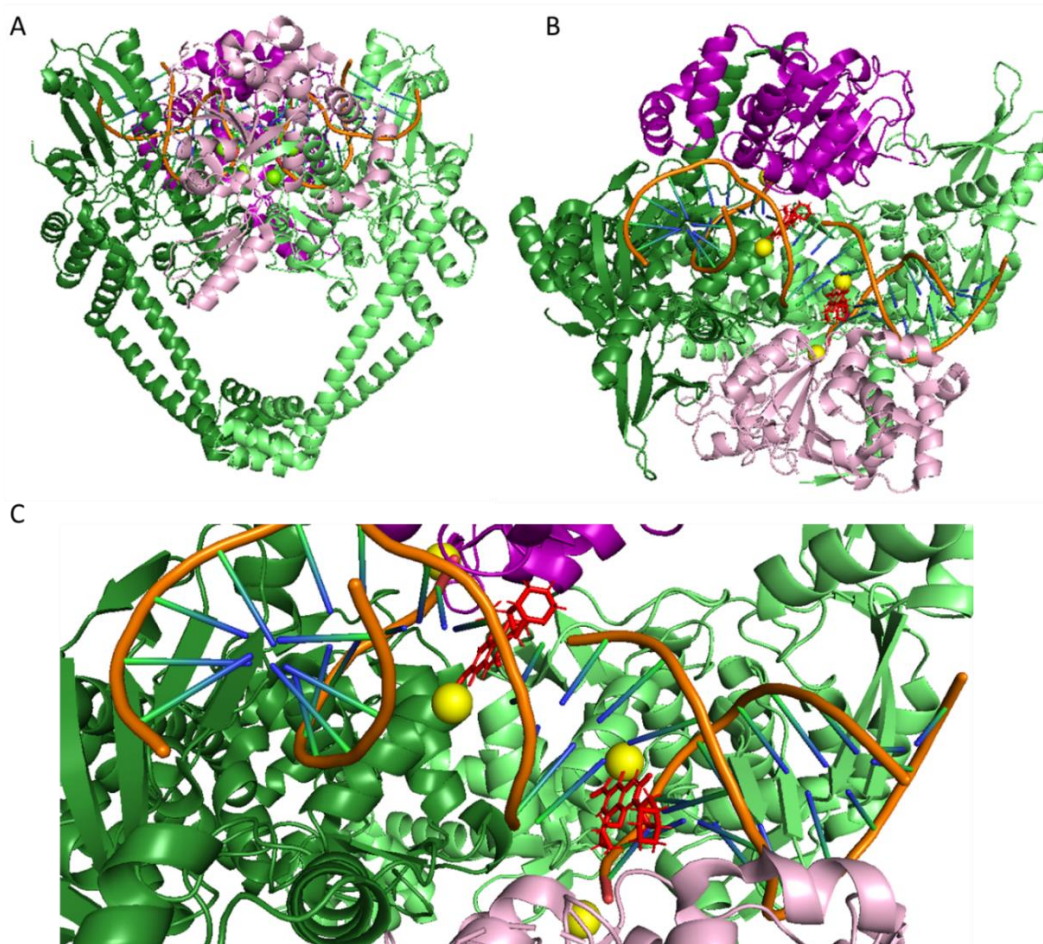
Fluorochinolony (ang. fluoroquinolones, FQ) to syntetyczna grupa chemioterapeutyków wywodząca się z chinolonów. Związki te zostały odkryte w latach 60. XX wieku, na skutek fluoryzacji pierścienia chinolonowego i wprowadzenia atomu fluoru w pozycji C-6. Zsyntetyzowane związki charakteryzowały się szerszym spektrum działania oraz większą aktywnością przeciwbakteryjną przez wzrost lipofilności, przenikalności przez błony bakteryjne i powinowactwa do gyrazy DNA (Ryc. 1.12)<sup>52,53</sup>.



Rycina 1.12 Schemat budowy fluorochinolonów. A) schematyczny wzór strukturalny opracowany z wykorzystaniem bazy ZINC20<sup>53</sup>, B) wzór strukturalny moksyflokscyny, pobrany z bazy PubChem<sup>54</sup>, numer CID 152946.

Mechanizm działania związków z grupy fluorochinolonów opiera się na wiązaniu do kompleksu topoisomerazy typu II z przeciętym DNA. Do kompleksu gyrazy z DNA wiążą się dwie cząsteczki związku, po jednej na każdą podjednostkę GyrA. Fluorochinolony interkalują pomiędzy pary zasad przeciętego segmentu G kwasu

nukleinowego (Ryc. 1.13). Grupa karbonylowa ( $-C=O$ ) przy węglu C-4 pierścienia chinolinowego oraz grupa karboksylowa ( $-COOH$ ) przy C-3 odpowiadają za chelatację jonu magnezu, który jest koordynowany przez cząsteczki wody. Pomiędzy cząsteczkami wody, a miejscem aktywnym gyrazy, obecne są wiązania wodorowe. Kompleks jest stabilizowany przez fluorochinolony, przez co ponowne łączenie pękniętego fragmentu DNA jest niemożliwe. W efekcie dochodzi do nagromadzenia dwuniciowych pęknięć oraz zahamowanie aktywności enzymu i zaburzenia podstawowych procesów komórkowych takich jak transkrypcja czy replikacja. Dodatkowo, występowanie pęknięć DNA prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji reaktywnych form tlenu, co również jest toksyczne dla komórki bakteryjnej<sup>43,53</sup>.



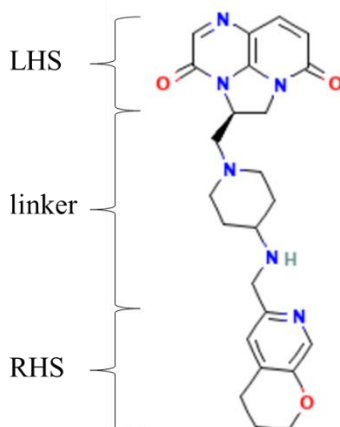
Rycina 1.13 Schemat struktury przestrzennej gyrazy *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 24 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności moksyflokscyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty). Kryształ 5BS8 (A, B, C) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

Początkowo ofloksacyna i ciprofloksacyna były szeroko stosowanymi chemioterapeutykami drugiego rzutu w leczeniu gruźlicy lekoopornej. Jednakże obecnie zostały zastąpione przez nowszą generację fluorochinolonów: moksyflokscynę i lewofloksacynę, które wykazują zwiększoną aktywność przeciwprątkową, lepszy profil farmakokinetyczny oraz posiadają mniej efektów ubocznych związanych z ich stosowaniem. Moksyflokscyna i lewofloksacyna obecnie zaliczane są do leków grupy A i są wykorzystywane szczególnie w leczeniu przypadków MDR-TB<sup>7,55</sup>. Pacjentom podaje się 400 mg moksyflokscyny raz na dobę<sup>7</sup> oraz w zależności od masy ciała 750 – 1500 mg lewofloksacyny raz na dobę<sup>56</sup>. Takie długotrwałe podawanie leków podczas leczenia gruźlicy może stwarzać ryzyko rozwoju oporności, ale może też prowadzić do pojawiania się działań niepożądanych jak zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego, tendinopatie czy zaburzenia rytmu serca<sup>57</sup>. Gatifloksacyna pomimo wysokiej aktywności względem *M. tuberculosis* została wycofana z rynku ze względu na zaburzenie glikemii<sup>58</sup>.

W ostatnich latach intensywnie poszukuje się nowych fluorochinolonów, zwłaszcza w kontekście narastającej oporności szczepów *M. tuberculosis*, które mogłyby uzupełnić lub w przyszłości zastąpić obecnie stosowane związki. W badaniu klinicznym, w którym wzięło udział 30 pacjentów z gruźlicą, fluorochinolon nowej generacji - sitafloksacyna, wykazywał lepszą aktywność bakteriobójczą niż izoniazyd i lewofloksacyna oraz charakteryzował się dobrym profilem bezpieczeństwa<sup>59</sup>. Ponadto w testach *in vitro* wykazano lepszą aktywność tego związku względem opornych szczepów niż w przypadku moksyflokscyny i lewofloksacyny. Dodatkowo część mutacji warunkujących oporność na obecnie stosowane FQ nie wpływała na aktywność sitafloksacyny, co daje potencjalną możliwość jej zastosowania w leczeniu lekoopornych przypadków gruźlicy<sup>60</sup>. Sitafloksacyna jest lekiem obecnie zarejestrowanym w Japonii do leczenia zapalenia płuc, zakażeń dróg oddechowych, układu moczowego czy jamy ustnej<sup>61</sup>. W testach *in vitro* bada się również skuteczność innych nowych fluorochinolonów jak finaflloksacyna i delafloksacyna względem *M. tuberculosis*<sup>62</sup>. Leki te są obecnie zatwierdzone do stosowania w leczeniu ostrego zapalenia ucha zewnętrznego (finaflloksacyna) oraz w ostrych bakteryjnych zakażeniach skóry i tkanek miękkich (delafloksacyna)<sup>63,64</sup>.

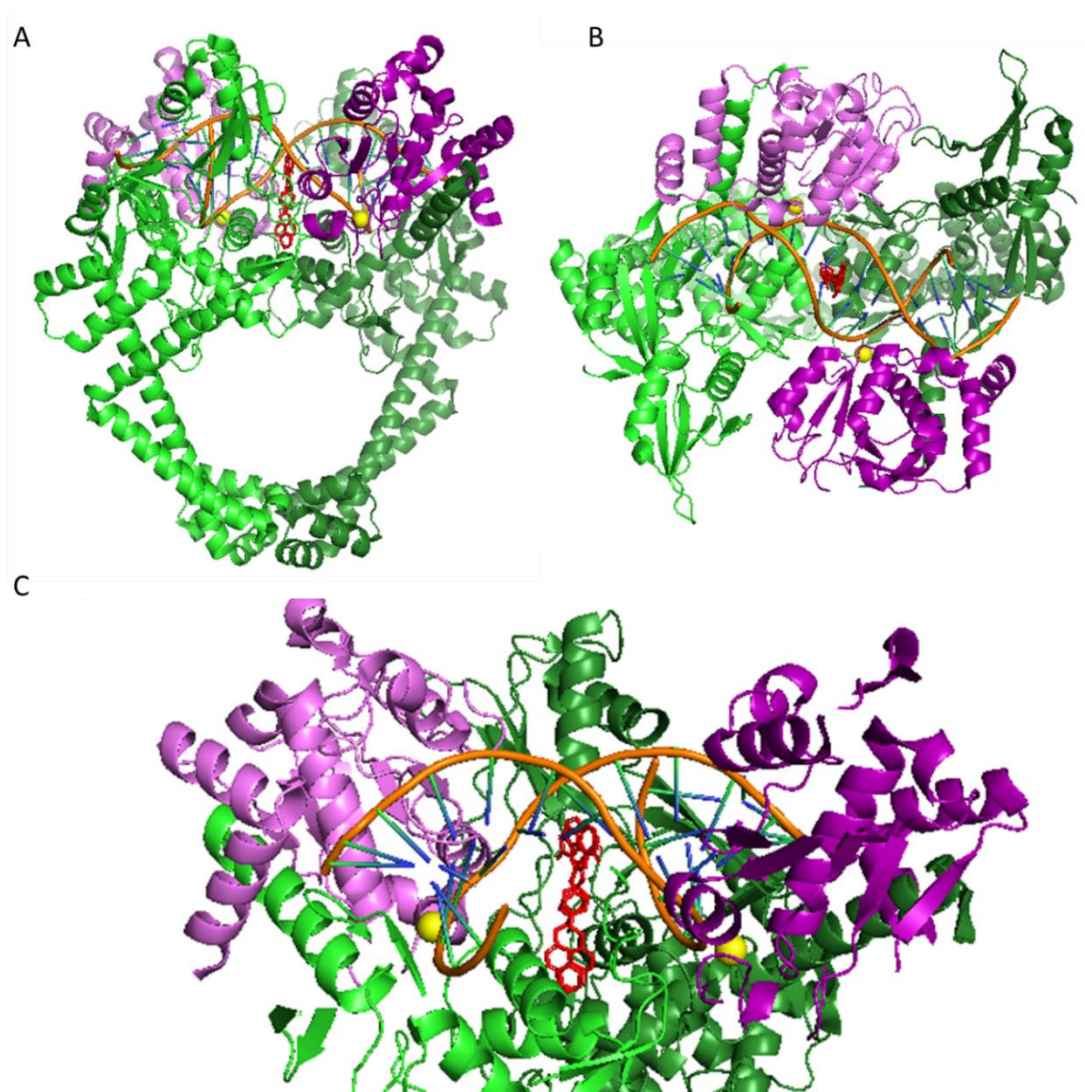
### 1.4.2 Nowe inhibitory bakteryjnych topoizomeraz

Obiecującą grupę związków, dla których celem molekularnym jest gyraza DNA, stanowi nowa klasa małych cząsteczek określanych jako NBTI (ang. Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors). Związki te zbudowane są z trzech fragmentów: części LHS (ang. left-hand side) odpowiedzialnej za interkalację pomiędzy DNA, części RHS (ang. right-hand side) o charakterze lipofilnym, odpowiedzialnej za wiązanie z GyrA oraz centralnego łącznika (ang. linker) (Ryc. 1.14)<sup>65</sup>. Fragment RHS odpowiada za wiązanie z hydrofobowymi resztami aminokwasowymi znajdującymi się na styku dwóch podjednostek GyrA. Z kolei płaski, aromatyczny pierścień fragmentu LHS wsuwa się równoległe pomiędzy sąsiadujące pary zasad DNA i uniemożliwia ponowne łączenie. Wiązanie DNA z LHS jest stabilizowane przez działanie sił van der Waalsa oraz wiązania  $\pi$ - $\pi$ . Kluczowa jest również bezpośrednia interakcja jonowa pomiędzy dodatnio naładowaną aminą centralnego łącznika, a kwasem asparaginowym Asp83 jednej podjednostki GyrA i za pośrednictwem cząsteczki wody drugiej podjednostki. Centralny łącznik jest uznawany za kluczowy element w wiązaniu i aktywności związków z grupy NBTI, jak również umożliwia prawidłowe ułożenie przestrzenne pozostałych części związku<sup>66,67</sup>. Związki z grupy NBTI stabilizują kompleks DNA-gyraza, ale w przeciwieństwie do fluorochinolonów, większość z nich prowadzi do utrzymania kompleksu z pęknięciami pojedynczej nici DNA, a nie obu. Do kompleksu DNA-gyraza wiąże się jedna cząsteczka związku, a ich działanie polega na hamowaniu aktywności enzymu przez uniemożliwienie wprowadzenia podwójnych pęknięć<sup>67</sup>.



Rycina 1.14 Schemat budowy gepotidacyny, GSK-2140944 (związku z grupy NBTI). Wzór strukturalny pobrano z bazy PubChem<sup>54</sup>, nr CID związku: 25101874.

Na rynku, dostępne są inhibitory gyrazy *M. tuberculosis* określane MGI (ang. Mycobacterial Gyrase Inhibitors) opracowane przez firmę GlaxoSmithKline. Stanowią one podklasę związków NBTI ukierunkowanych na działanie względem topoiizomerazy typu II tego patogenu<sup>67</sup>. Wiodącym związkiem przeciwpłatkowym z grupy NBTI jest gepotidacyna (Ryc. 1.14, Ryc. 1.15), zdolna do hamowania 50% aktywności gyrazy (ang. half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) w stężeniu 4 μM, a wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (ang. minimum inhibitory concentration, MIC) wynosi 0,86 μM.



Rycina 1.15 Schemat struktury przestrzennej gyrazy *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 150 par zasad (pomarańczowy) w obecności gepotidacyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty). Kryształ 8S7K (A, B, C) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

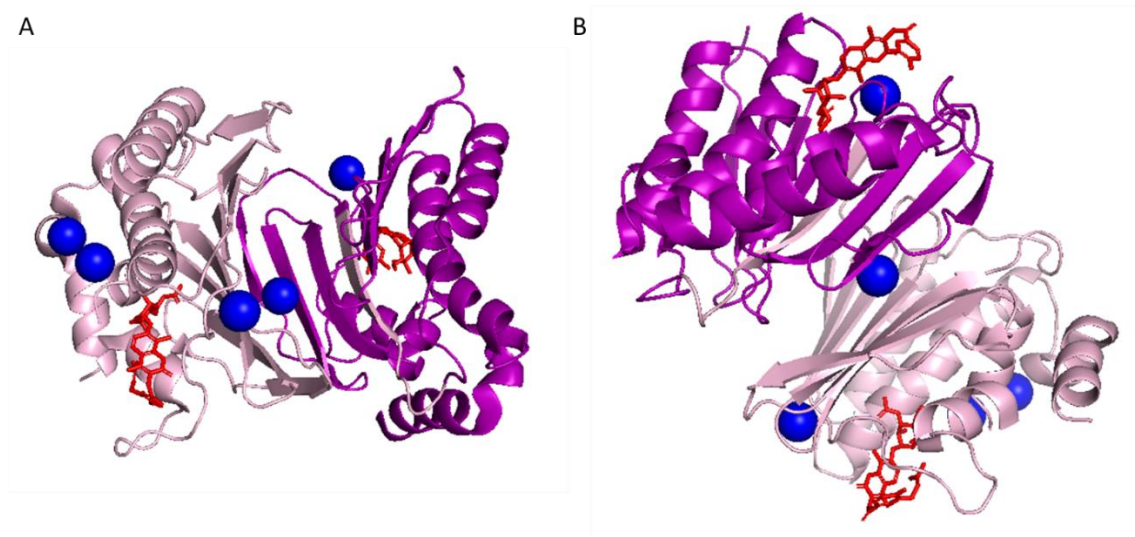
Gepotidacyna jest lekiem zarejestrowanym klinicznie i stosuje się ją w niektórych krajach w leczeniu niepowikłanych zakażeń układu moczowego<sup>68</sup>. Ponadto jest w trzeciej fazie badań klinicznych do wykorzystania w leczeniu rzeżączki<sup>69</sup>. Niedawno opisany inhibitor AMK32b z omawianej grupy związków, charakteryzuje się wysoką aktywnością względem prątka gruźlicy z wartością  $IC_{50}$  równą  $0,17 \mu M$  w analizie zahamowania wzrostu szczepu referencyjnego *M. tuberculosis* H37Rv na podstawie pomiarów gęstości optycznej oraz  $IC_{50}$  wynoszącym  $96 \text{ nM}$  w enzymatycznym teście *in vitro*<sup>65</sup>. Ponadto wykazano możliwość zastosowania tych związków w leczeniu infekcji prątkami niegruźliczymi (ang. non-tuberculous mycobacteria, NTM), między innymi *Mycobacterium abscessus* powodującego choroby płuc, których leczenie jest szczególnie wymagające ze względu na wysoką naturalną lekooporność szczepów<sup>67</sup>. Ze względu na nowy mechanizm działania oraz brak oporności krzyżowej z fluorochinolonami, związki NBTI stanowią obiecującą grupę do zastosowania w leczeniu gruźlicy, choć problemem jest ich kardiotoksyczność<sup>66</sup>.

### 1.4.3 Aminokumaryny

Aminokumaryny to inhibitory domeny ATPazowej podjednostki B gyrazy DNA. Do grupy tych związków zalicza się nowobiocynę, klorobiocynę czy kumermycynę A. Stanowią one naturalne antybiotyki wytwarzane przez szczepy z rodzaju *Streptomyces*. Aminokumaryny konkurują z ATP o miejsce wiązania w N-terminalnej domenie GyrB, przez co działają na zasadzie inhibitora kompetycyjnego (Ryc. 1.16). Zahamowanie wiązania ATP, a zatem hydrolizy i pozyskiwania energii prowadzi do utraty aktywności gyrazy, a dalej do zaburzenia podstawowych procesów komórkowych związanych z metabolizmem kwasów nukleinowych i śmierci komórki bakteryjnej<sup>70,71</sup>.

Nowobiocyna była stosowana w leczeniu infekcji wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie, jednak ze względu na dużą toksyczność, niekorzystną farmakokinetykę oraz mniejszą aktywność względem bakterii Gram-ujemnych, nie jest już zalecana do stosowania w leczeniu infekcji. Pomimo potwierdzonej *in vitro* zdolności nowobiocyny do hamowania aktywności gyrazy DNA *M. tuberculosis*, związki te nie zostały nigdy włączone do schematu leczenia gruźlicy ze względu na ich toksyczność, ale również na słabą przenikalność przez ścianę komórkową prątków<sup>71-73</sup>. Nowobiocyna hamuje wzrost szczepu *M. tuberculosis* H37Rv przy wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC)

4 mg/L. Możliwości wprowadzania modyfikacji w strukturze tej grupy związków oraz poszukiwania nowych pochodnych daje perspektywę ich przyszłego wykorzystania w leczeniu gruźlicy<sup>71</sup>.

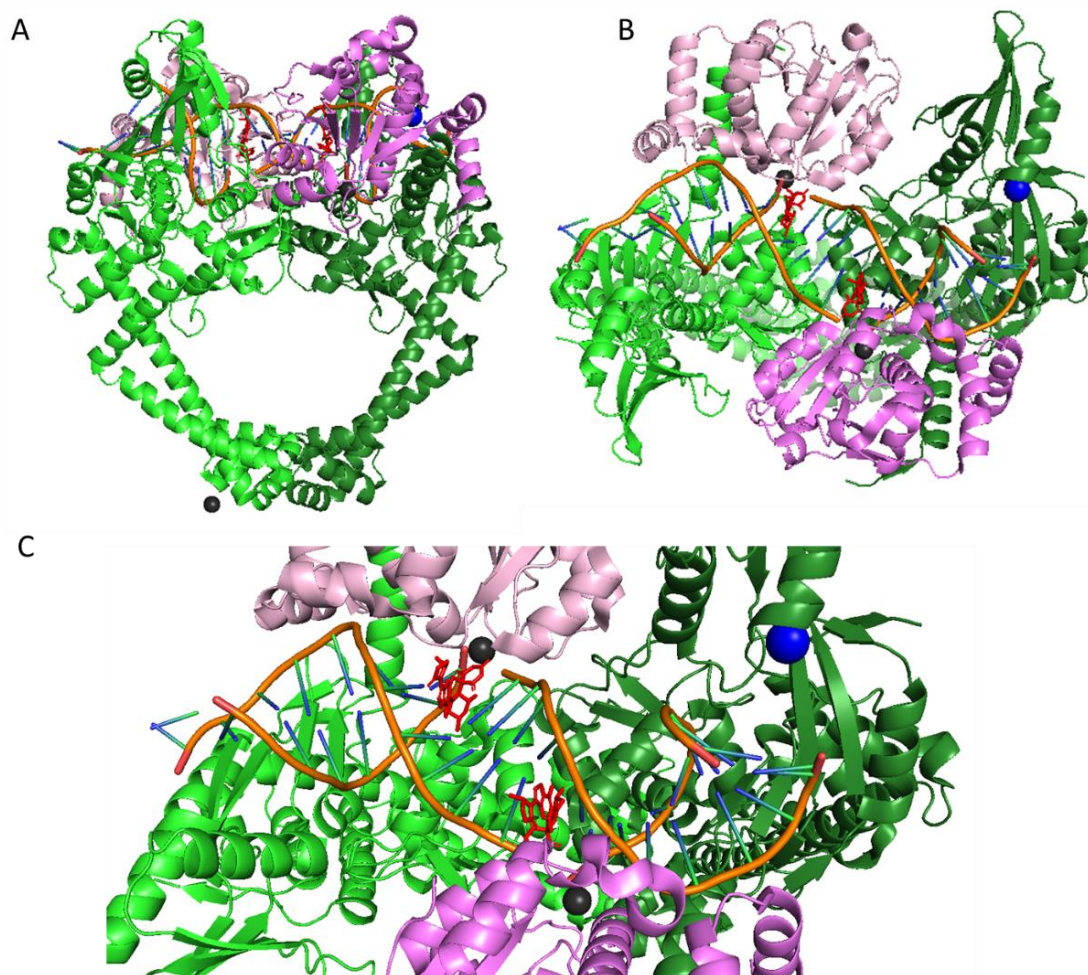


Rycina 1.16 Schemat struktury przestrzennej dimeru domeny ATPazowej gyrazy DNA *M. smegmatis* (różowy, fioletowy) w obecności nowobiocyny (czerwony) i jonów sodu (niebieski). Kryształ 6Y8O (A, B) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

#### 1.4.4 Spiropirimidynetrony

Grupa związków zdolna do wiązania kompleksów DNA-gyaza w innym miejscu niż fluorochinolony to spiropirimidynetrony (ang. spiropyrimidinetriones, SPT). Takie wiązanie sprawia, że nie dochodzi do rozwoju oporności krzyżowej, co daje możliwość zastosowania tych związków w leczeniu zakażeń szczepami *M. tuberculosis* opornymi na obecnie stosowane fluorochinolony. Związki z grupy SPT stabilizują kompleks przeciętego DNA z gyrazą, niezależnie od obecności jonów magnezu, co prowadzi do nagromadzenia dwuniciowych pęknięć DNA, a takie uszkodzenia genomu są letalne dla komórki bakteryjnej. Odpowiednie modyfikacje prowadzą do selektywnego działania względem gyrazy *M. tuberculosis*, co jest korzystne z punktu widzenia mikroflory bakteryjnej człowieka i ryzyka rozwoju oporności podczas koinfekcji<sup>74</sup>. Przedstawiciel tej klasy związków, zoliflodacyna, jest doustnym antybiotykiem będącym w zaawansowanym stadium rozwoju klinicznego w terapii rzeżączki<sup>75</sup>. Z kolei związek

H3D-005722 to wiodący kandydat z tej grupy, hamujący aktywność gyrazy prętka gruźlicy o podobnej aktywności do moksyfloksacyny i ciprofloksacyny, a nawet większej niż w przypadku zoliflodacyny (Ryc. 1.17)<sup>76</sup>.

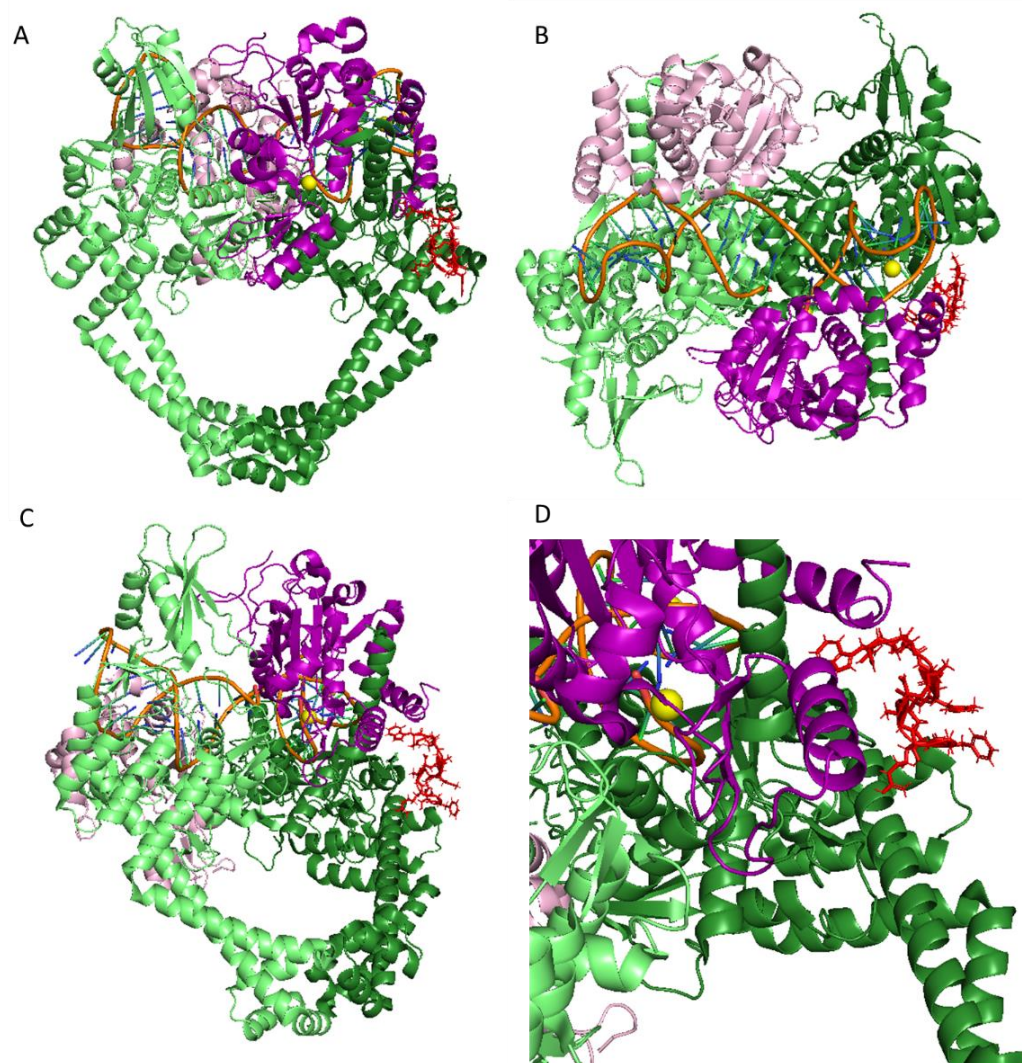


Rycina 1.17 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *Staphylococcus aureus* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 20 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności zoliflodacyny (czerwony) oraz jonów sodu (niebieski) i manganu (czarny). Kryształ 8BP2 (A, B, C) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

#### 1.4.5 Inne inhibitory gyrazy DNA *M. tuberculosis*

Wśród niedawno odkrytych związków (w 2022 roku) jest ewybaktyna, która jest makrocyklicznym peptydem wytwarzanym przez bakterie *Photorhabdus noenieputensis*. Celem działania tego związku jest gyraza DNA. Wykazano, że ewybaktyna działa selektywnie względem prętka gruźlicy, prawdopodobnie przez obecność transportera

BacA w błonie komórkowej *M. tuberculosis*. Mechanizm działania peptydu opiera się na jego wiązaniu allosterycznym z podjednostką A gyrazy, co powoduje zmiany konformacyjne w centrum aktywnym odpowiedzialnym za cięcie DNA (Ryc. 1.18)<sup>77</sup>.



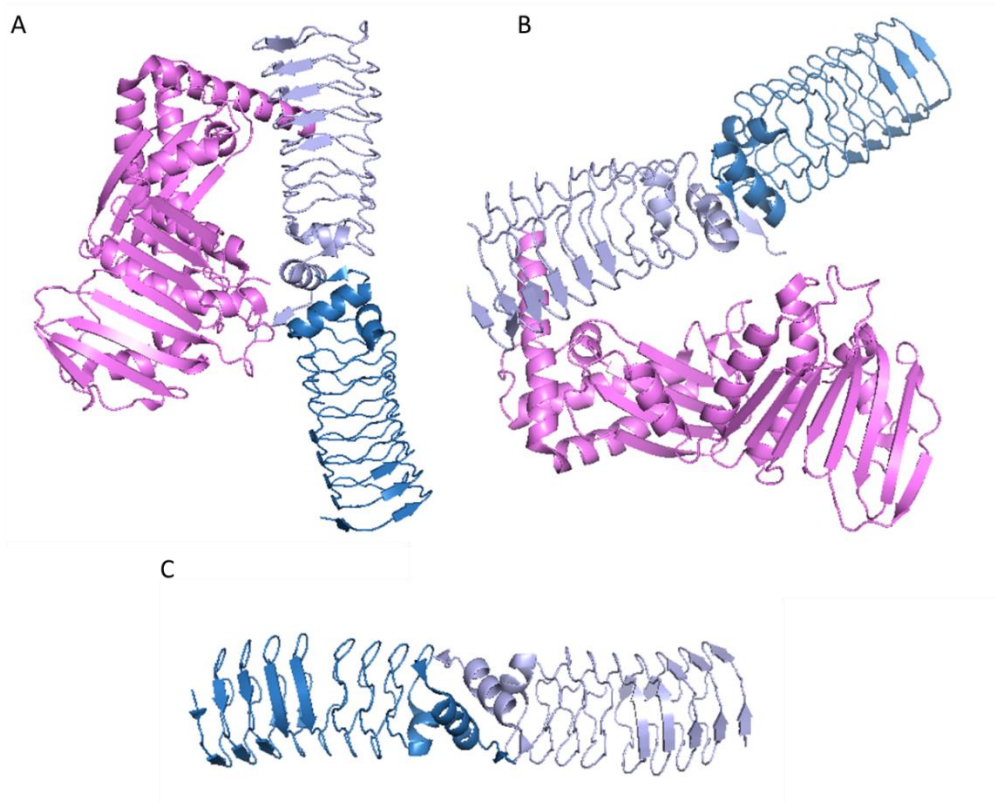
Rycina 1.18 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 46 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności ewybaktyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty). Kryształ 7UGW (A, B, C) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

W ostatnich latach rośnie zainteresowanie inhibitorami podjednostki B gyrazy DNA. Takie podejście daje możliwość poszukiwania związków skutecznych względem bakterii niezależnie od obecności mutacji w gyrazie DNA warunkujących oporność na fluorochinolony. Jedną z grup takich związków są pirolaminy. Wartości MIC względem *M. tuberculosis* H37Rv związków z tej grupy wynosiły 0,015-1 µg/ml i były skuteczne

również względem lekoopornych, klinicznych szczepów prątki. Ponadto testowane związki hamowały połowę aktywności gyrazy DNA prątki gruźlicy w stężeniu mniejszym niż 5 nM, a wartości Kd poniżej 0,6 nM świadczą o wysokim powinowactwie do podjednostki GyrB. Potwierdzono również ich skuteczność w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem mysich modeli<sup>78</sup>. Inną grupą związków o potencjalnym działaniu przeciwgruźliczym są związki z grupy moczników tiazolopirydynowych, które działają przez hamowanie aktywności ATPazowej GyrB, a wartości MIC względem szczepu *M. tuberculosis* dla inhibitorów z tej grupy wynoszą 2 - 21  $\mu\text{M}$ <sup>79</sup>. Podobnie działają związki będące pochodnymi karbazoli, benzoindolu, czy indolu, zdolne do hamowania aktywności ATPazowej w 50% (IC<sub>50</sub>) przy stężeniu <1  $\mu\text{M}$  i z wartościami MIC względem szczepu *M. tuberculosis* H37Rv <25  $\mu\text{g/ml}$ <sup>80</sup>. Cyklotialidyny również hamują aktywność ATPazową gyrazy, jednak ich aktywność wobec *M. tuberculosis* nie jest dokładnie poznana, a wobec gyrazy DNA *M. smegmatis* wykazano znacznie mniejszą aktywność związków z tej grupy niż w przypadku testów z białkiem *E. coli*<sup>81</sup>.

Prowadzone są także badania zmierzające do zahamowania aktywności gyrazy z wykorzystaniem białek. Proponowane jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych. W badaniach wykorzystano przeciwciała klasy IgG: MsGyrA:C3 oraz MsGyrA:H11 mające zdolność do wiązania regionu części N-terminalnej GyrA, przez co uniemożliwiają uwolnienie segmentu T kwasu nukleinowego z kompleksu enzym-DNA i hamują aktywność gyrazy. Przeciwciała mogą stanowić punkt wyjścia do projektowania nowych inhibitorów peptydowych podjednostki A gyrazy DNA<sup>82</sup>.

Innym proponowanym peptydowym inhibitorem gyrazy jest białko MfpA (ang. Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A) z *M. tuberculosis*, które należy do rodziny białek pentapeptydowych (ang. pentapeptide repeat proteins, PRP). Jego sekwencja składa się z szeregu powtórzeń motywu pentapeptydowego, które fałdują się w charakterystyczną prawoskrętną  $\beta$ -helisę. Taka struktura MfpA naśladuje cząsteczkę DNA i konkuruje z nim o wiązanie do gyrazy DNA (Ryc. 1.19). Białko to prowadzi do zahamowania wszystkich aktywności gyrazy, ale również pośrednio chroni przed toksycznym wpływem fluorochinolonów<sup>83</sup>.



Rycina 1.19 Schemat struktury przestrzennej A), B) fragmentu N-terminalnego podjednostki B gyrazy DNA *M. smegmatis* (fioletowy) z homodimerem białka MfpA *M. smegmatis* (niebieski) oraz C) homodimeru białka MfpA *M. tuberculosis* (niebieski). Kryształ 6ZT5 (A, B) oraz 2BM4 (C) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

Innym białkiem zdolnym do hamowania aktywności gyrazy DNA jest MurI, którego główną funkcją jest udział w szlaku biosyntezy peptydoglikanu przez racemizację L-glutaminianu do D-glutaminianu. Dodatkowo MurI, podczas podziałów komórkowych, zmniejsza zdolność gyrazy do wiązania DNA, a tym samym, przez zahamowanie nadmiernej aktywności gyrazy, reguluje topologię DNA bakterii<sup>84</sup>.

### 1.5 Mutacje w genach gyrazy DNA

Nieprawidłowe przyjmowanie leków, przerywanie terapii, długi czas leczenia oraz nieprawidłowo dobrane schematy leczenia, mogą prowadzić do rozwoju oporności na stosowane leki. Rozwój oporności nabytej związany jest z pojawianiem się mutacji punktowych w genach kodujących cele molekularne leków lub cząsteczek uczestniczących w ich transporcie i metabolizmie, co prowadzi do zmniejszenia

powinowactwa leku do miejsca wiązania, obniżenia jego wewnątrzkomórkowego stężenia lub całkowitego unieczynnienia. W przypadku inhibitorów gyrazy DNA *M. tuberculosis*, oporność pojawia się w wyniku mutacji w genach *gyrA* oraz *gyrB* kodujących podjednostki białka<sup>85</sup>.

Większość jak dotąd zdefiniowanych mutacji dotyczy oporności na fluorochinolony, chemioterapeutyki stosowane w leczeniu gruźlicy. Mutacje te pojawiają się głównie w regionach determinujących oporność na chinolony, QRDR (ang. quinolone resistance-determining region) i obejmują kodony 74-113 dla GyrA oraz kodony 461-540 dla GyrB<sup>86</sup>. Na podstawie analiz asocjacyjnych GWAS (ang. genome-wide association study) z wykorzystaniem ponad 52 tysięcy szczepów, w lipcu 2023 roku, WHO opracowało katalog mutacji zidentyfikowanych w genomach szczepów *Mycobacterium tuberculosis complex*. W katalogu opisano m. in. mutacje w *gyrA* oraz *gyrB* warunkujące oporność na lewofloksacynę i moksyfloksacynę – 18 substytucji (Tab. 1.1), mutacje niezwiązane z występowaniem oporności na fluorochinolony – 14 substytucji, oraz te których znaczenie nie jest znane – 760 substytucji aminokwasowych. Najczęściej pojawiające się mutacje związane z występowaniem oporności na fluorochinolony to substytucje w kodonie 90 i 94 GyrA<sup>87</sup>.

Tabela 1.1 Substytucje w GyrA oraz GyrB warunkujące lekooporność na fluorochinolony wymienione w opublikowanym przez WHO “Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis complex* and their association with drug resistance, 2nd ed”<sup>87</sup>. Według klasyfikacji WHO „associated with resistance” wskazuje, że dana mutacja jest związana z występowaniem oporności i stanowi marker, natomiast „associated with resistance – interim” dotyczy mutacji, które najprawdopodobniej są związane z występowaniem oporności, ale co do nich nie ma potwierdzonych dowodów.

Gen	Mutacja	Klasyfikacja według WHO
<i>gyrA</i>	p.Gly88Ala	associated with resistance – interim
<i>gyrA</i>	p.Gly88Cys	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Asp89Asn	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Ala90Val	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Ser91Pro	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Asp94Ala	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Asp94Asn	associated with resistance

<i>gyrA</i>	p.Asp94Gly	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Asp94His	associated with resistance
<i>gyrA</i>	p.Asp94Tyr	associated with resistance
<i>gyrB</i>	p.Asp461His	associated with resistance – interim
<i>gyrB</i>	p.Asp461Asn	associated with resistance
<i>gyrB</i>	p.Ser447Phe	associated with resistance – interim
<i>gyrB</i>	p.Asn499Asp	associated with resistance
<i>gyrB</i>	p.Asn499Thr	associated with resistance
<i>gyrB</i>	p.Glu501Asp	associated with resistance – interim
<i>gyrB</i>	p.Glu501Val *	associated with resistance – interim
<i>gyrB</i>	p.Ala504Val	associated with resistance – interim

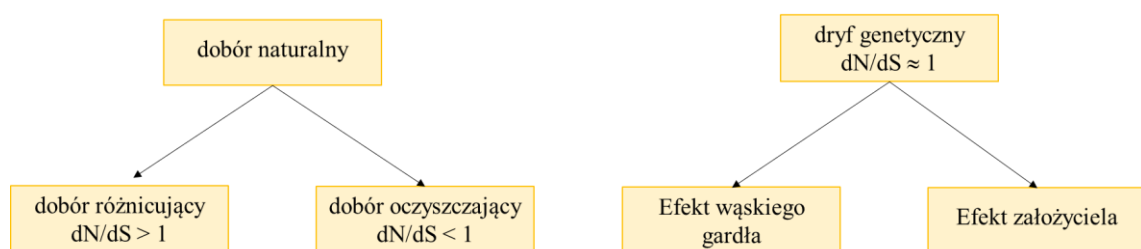
\* Mutacja uwzględniona w katalogu WHO jako związana z pojawianiem się oporności na fluorochinolony ze względu na wynik testu genotypowego i mutacji w kodonie 501 *gyrB*, w którym mutacje E501D powodują pojawianie się oporności.

Z punktu widzenia oceny oporności szczepów *M. tuberculosis* na FQ, najważniejsze są mutacje w gyrazie DNA. Niemniej jednak na oporność prątków na fluorochinolony mogą wpływać również inne mechanizmy, jak na przykład nadekspresja pomp wyrzutu. Zaobserwowano, że zwiększona ekspresja pompy PstB, z rodziny transporterów ABC, wpływała na wzrost wartości MIC lewofloksacyny w przypadku klinicznych szczepów *M. tuberculosis*<sup>88</sup>. Dodatkowo zauważono, że nadprodukcja białka MfpA, pentapeptydu naśladującego DNA, również może przyczyniać się do wzrostu oporności na fluorochinolony<sup>89</sup>. Inny niedawno opisany mechanizm oporności na fluorochinolony zależny od GyrB wskazuje na istotną rolę sukcylnilacji w nabywaniu oporności. Za tę potranslacyjną modyfikację odpowiada acetylotransferaza Eis, której zwiększona ekspresja prowadzi do wzrostu wartości MIC fluorochinolonów względem szczepów *M. tuberculosis*<sup>90</sup>.

## 1.6 Wzorcowanie ewolucyjne

W toku ewolucji dochodzi do utrwalania zmienności w populacji na drodze doboru naturalnego oraz dryfu genetycznego (Ryc. 1.20). Dryf jest wynikiem losowych zdarzeń, a przykładami działania dryfu genetycznego jest efekt wąskiego gardła oraz efekt założyciela. Efekt wąskiego gardła polega na nagłym zmniejszeniu liczebności populacji

na skutek katastrofy czy kataklizmu. Ocalałe osobniki odtwarzają populację, która jednak nie posiada już takiej samej puli genowej. Efekt założyciela polega na odłączeniu od populacji wyjściowej niewielkiej grupy osobników, która na nowym obszarze tworzy populację o odmiennej puli genowej<sup>91</sup>. Dobór naturalny prowadzi do ukierunkowanych zmian w populacji, które zwiększają adaptację do warunków środowiskowych. Osobniki o niekorzystnych genotypach są eliminowane, a zwyciężają osobniki posiadające genotyp warunkujący fenotyp o lepszym przystosowaniu do warunków środowiskowych. Działanie doboru naturalnego ma wpływać na dostosowanie organizmu, jego zdolność do przetrwania i przekazania informacji. Dobór naturalny działa na sekwencje białek w dwóch kierunkach: jako oczyszczający lub różnicujący. Dobór oczyszczający ogranicza zmienność aminokwasów na danej pozycji, jeśli nawet w kodonach pojawiają się mutacje w nukleotydach to prowadzą do podstawień synonimicznych, które nie wpływają na zmianę kodowanego aminokwasu. Aminokwasy na pozycjach pod wpływem działania doboru oczyszczającego są uznawane za konserwatywne. Z kolei pozycje będące pod działaniem doboru różnicującego charakteryzują się zmiennością na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym, wyższą niż wynikałoby z rachunku prawdopodobieństwa. Dana pozycja aminokwasowa podlega częstym zmianom w populacji, na przykład na skutek działania antybiotyków, które powodują tzw. presję selekcyjną, w wyniku której w populacji utrwalane są mutacje punktowe związane z powstawaniem lekooporności<sup>91-93</sup>.



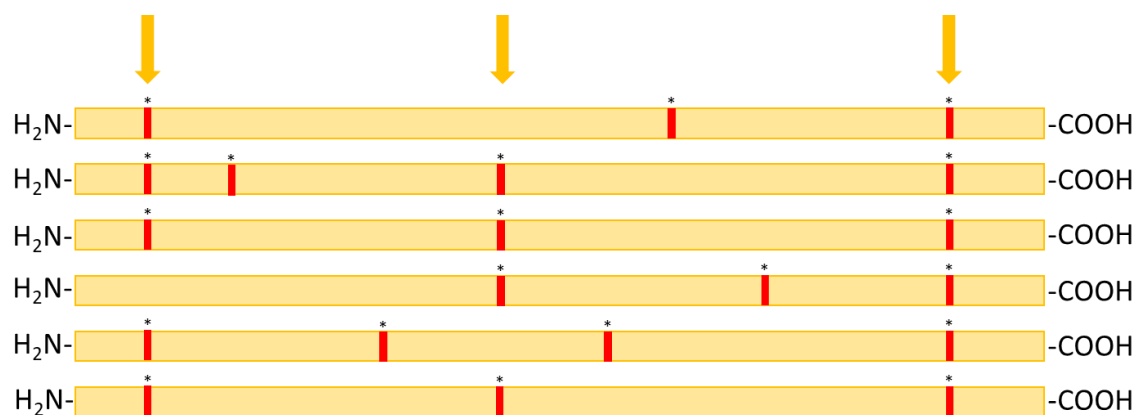
Rycina 1.20 Schemat przedstawiający mechanizmy ewolucji.

Każda pozycja aminokwasowa, zależnie od pierwotnie kodowanego aminokwasu, ma inny potencjał do podlegania mutacjom synonimicznym i niesynonimicznym. Zliczenie pojawiania się mutacji synonimicznych (dS) i niesynonimicznych (dN), z uwzględnieniem rachunku prawdopodobieństwa pojawiania się zmian, pozwala na obliczenie współczynnika siły i kierunku działania doboru naturalnego ( $\omega = dN/dS$ ) na

daną pozycję aminokwasową. Kiedy podstawienia niesynonimiczne przeważają nad synonimicznymi ( $dN/dS > 1$ ), to na daną pozycję, wedle modeli matematycznych, działa dobór różnicujący. Kiedy podstawienia niesynonimiczne są rzadsze niż synonimiczne ( $dN/dS < 1$ ), to dana pozycja znajduje się pod wpływem działania doboru oczyszczającego. Natomiast kiedy stosunek podstawień jest z rachunku prawdopodobieństwa równy ( $dN/dS \sim 1$ ) dana pozycja ulega dryfowi genetycznemu<sup>94</sup>.

Pojawianie się mutacji i zmienność aminokwasów w sekwencji białkowej, może być analizowane metodą wzorcowania ewolucyjnego (ang. evolutionary patterning, EP). Metoda ta opiera się na badaniu zmienności wielu sekwencji wybranego genu w danej populacji szczepów i pozwala ocenić siłę i kierunek działania doboru naturalnego. Wzorcowanie ewolucyjne z założenia umożliwia identyfikację miejsc silnie konserwatywnych, nie mogące podlegać mutacjom, które znalazły się pod działaniem doboru oczyszczającego i mogłyby stanowić potencjalnie dobre miejsca wiązania dla nowych leków. Z drugiej strony możliwa jest identyfikacja miejsc charakteryzujących się większą zmiennością, będących pod działaniem doboru różnicującego i stanowiących potencjalne miejsca tworzenia mutacji związanych z nabywaniem lekooporności pod wpływem presji ze strony antybiotykoterapii<sup>93</sup>.

W zbiorze sekwencji białka w danej populacji obserwuje się, że część zmian aminokwasowych pojawia się w charakterystycznych pozycjach tworząc wzorce ewolucyjne (Ryc. 1.21). Na podstawie modeli matematycznych możliwe jest określenie stosunku podstawień niesynonimicznych do synonimicznych - współczynnika  $dN/dS$ , którego wartość wskazuje czy dany kodon jest pod działaniem doboru oczyszczającego, różnicującego czy może działa na niego dryf genetyczny (Ryc. 1.20)<sup>93</sup>.



Rycina 1.21 Schemat przedstawiający poszukiwanie wzorców ewolucyjnych (zaznaczone strzałkami) na podstawie substytucji (czerwone) w sekwencji aminokwasowej białek.

Do tej pory metoda wzorcowania ewolucyjnego nie została eksperymentalnie zweryfikowana. Prątki gruźlicy mogą stanowić dobry model badawczy do analiz opartych na tej metodzie ze względu na niską zmienność związaną z pojawianiem się mutacji punktowych. Różnorodność genetyczna wśród szczepów *M. tuberculosis* jest niewielka, obserwuje się bowiem aż 99% podobieństwo pomiędzy nimi. U tego gatunku nie obserwuje się horyzontalnego transferu genów, a różnorodność genetyczna jest związana głównie z obecnością polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) w genomie<sup>93,95</sup>.

## 2. Cel pracy

Głównym celem pracy była ocena możliwości wykorzystania wzorcowania ewolucyjnego do optymalizacji chemoterapii gruźlicy oraz usprawnienia diagnostyki lekoopornych szczepów *M. tuberculosis*.

Cel ten realizowano przez następujące cele cząstkowe:

- ✓ Identyfikację pozycji aminokwasowych w genach kodujących gyrazę DNA *M. tuberculosis* będących pod działaniem doboru naturalnego, na podstawie analizy bioinformatycznej opartej o wzorcowanie ewolucyjne.
- ✓ Eksperymentalną weryfikację znaczenia wybranych mutacji punktowych w gyrazie DNA na funkcjonowanie *M. tuberculosis*, poprzez konstrukcję mutantów i ich analizy fenotypowe.
- ✓ Weryfikację wpływu mutacji związanych ze wzrostem oporności na aktywność gyrazy oraz ocenę znaczenia wybranych miejsc konserwatywnych w testach *in vitro* z wykorzystaniem białek rekombinowanych.
- ✓ Identyfikację inhibitorów gyrazy DNA *M. tuberculosis* z wykorzystaniem badań bioinformatycznych.
- ✓ Ocenę aktywności potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA w testach *in vitro* (test oceny superskręcania DNA) oraz *in vivo* (test oceny wrażliwości szczepów *M. tuberculosis* - MABA).

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Analizy bioinformatyczne

##### 3.1.1 Poszukiwanie kodonów pod wpływem działania doboru naturalnego

Analizy mające na celu określenie kierunku i siły działania doboru naturalnego na geny *gyrA* i *gyrB* kodujące podjednostki gyrazy DNA *M. tuberculosis*, przeprowadzono z wykorzystaniem szeregu narzędzi bioinformatycznych. W tym celu wykorzystano bazy sekwencji genetycznych 3798 szczepów gatunku *Mycobacterium tuberculosis*, 165 przedstawicieli gatunków z rodzaju *Mycobacterium* oraz zbudowano bazę 377 przedstawicieli gatunków z typu *Actinobacteria*. Bazę zbudowano poprzez pobranie sekwencji genomowych z bazy NCBI Genome. Następnie pliki zawierające wybrane sekwencje oczyszczono ze zduplikowanych odczytów oraz usunięto sekwencje o niskiej jakości sekwencjonowania składające się z wielu kontigów. W ten sposób otrzymano bazę składającą się z 340 sekwencji genomów reprezentujących 340 gatunków bakterii należących do typu *Actinobacteria*. Za pomocą oprogramowania Geneious Prime i narzędzia MAFFT Alignment przeprowadzono dopasowanie wielosekwencyjne. Sekwencje poddano obróbce w celu otrzymania unikatowych sekwencji, dla których ponownie przeprowadzono dopasowanie wielosekwencyjne. Tak przygotowane sekwencje zostały wykorzystane do dalszych badań z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych pakietu HyPhy (FELL, FUBAR, SLAC, MEME) oraz MEGA7, które miały na celu określenie wpływu doboru naturalnego, na podstawie stosunku liczby podstawień niesynonimicznych (dN) do liczby podstawień synonimicznych (dS) dla danej pozycji aminokwasowej, czyli dN/dS. Jako wartości krytyczne przyjęto prawdopodobieństwo p-value <0,05 dla SLAC, FEL, MEME oraz MEGA i prawdopodobieństwo a'posteriori 0,95 dla FUBAR. Do dalszych analiz wybrano wszystkie kodony będące pod wpływem działania doboru różnicującego w bazie sekwencji szczepów *M. tuberculosis*, ponieważ obecność tego rodzaju doboru może być związana z presją selekcyjną spowodowaną przez stosowanie antybiotyków i może być odpowiedzialna za tworzenie lekooporności. Ze względu na dużą liczbę wykrytych kodonów pod działaniem doboru oczyszczającego wybrano kodony silnie konserwatywne, czyli kodony które: 1) w trzech bazach sekwencji genetycznych nie wykazywały substytucji niesynonimicznych, 2) zidentyfikowano przynajmniej w dwóch bazach sekwencji nukleotydowych jako będące pod wpływem doboru oczyszczającego

przez wszystkie programy pakietu HyPhy oraz 3) wykazywały minimalny znormalizowany stosunek dN/dS na poziomie pięciu w bazie *Mycobacterium* i trzech w bazie *Actinobacteria* w przypadku *gyrA*, natomiast w przypadku *gyrB* stosunek wynosił trzy.

Następnie wybrane kodony genów *gyrA* i *gyrB* analizowano pod kątem przewidywania wpływu substytucji aminokwasowych na funkcjonowanie białka za pomocą programów pakietu PredictSNP (obejmującego narzędzia SIFT, PolyPhen-1, Poly-Phen2, MAPP, PhD-SNP)<sup>96</sup>. W przypadku kodonów pod doborem różnicującym do dalszych badań wybrano te substytucje aminokwasowe, które obserwowano w populacji klinicznych szczepów *M. tuberculosis*. Dla kodonów pod doborem oczyszczającym wybrano podstawienia, które w analizie PredictSNP nie wpływały negatywnie na funkcjonowanie białka lub ten wpływ był jak najmniejszy w analizie właściwości hydrofobowych aminokwasów.

Dokładny opis i wyniki analiz *in silico* zostały zawarte w pracy magisterskiej „Gyraza *Mycobacterium tuberculosis* jako tarcza dla leków przeciwprątkowych”, Daria Zygała, Uniwersytet Łódzki, 2021 rok.

### **3.2 Poszukiwanie inhibitorów gyrazy DNA**

#### **3.2.1 Poszukiwanie inhibitorów gyrazy *M. tuberculosis* przez dokowanie molekularne**

Do identyfikacji inhibitorów gyrazy wykorzystano dokowanie molekularne, które zostało przeprowadzone we współpracy z Instytutem Farmakologii imienia Jerzego Maja, Polskiej Akademii Nauk w Krakowie przez dr Sabinę Podlewską. Metoda ta polega na ocenie siły oddziaływania ligandów z receptorem i wyborze związków wiążących się do ligandu.

W pierwszym podejściu poszukiwano potencjalnych inhibitorów wiążących się do kodonów gyrazy, w których substytucje związane są z pojawianiem się lekooporności. W tym celu wykorzystano kryształy gyrazy 6GAV i 5BTA dostępne w bazie Protein Data Bank<sup>27</sup> oraz skonstruowano modele homologiczne kompleksu białkowego w oparciu o kryształ 6GAV, noszące mutacje A90V i D94G oraz w oparciu o kryształ 5BTA – noszący mutacje A90V. Substytucje w tych kodonach związane są z pojawianiem się

oporności na fluorochinolony. Poszukiwanie związków wiążących się do białek z takimi mutacjami daje możliwość identyfikacji związków skutecznych względem opornych szczepów *M. tuberculosis*. Do przygotowanych kryształów białek przeprowadzono dokowanie związków obecnych w bazie ChemBridge. Po przyjęciu odpowiednich progów odcięcia po wartości funkcji oceniającej programu dokującego (Glide) zidentyfikowano część wspólną zbiorów związków z dokowań do poszczególnych białek. Zamówiono związki, które były dostępne w ilości co najmniej 1 mg w firmie Chemat.

W drugiej próbie poszukiwania potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA wiążących się do wybranych miejsc konserwatywnych podczas dokowania wykorzystano kryształ domeny ATPazowej GyrB oraz gyrazy DNA *M. tuberculosis* (3ZKD, 6GAV z bazy PDB) i dokowano związki z bazy BindingDB oraz ChEMBL. Zakupiono związki dostępne w bibliotece MCULE.

### **3.2.2 Poszukiwanie inhibitorów gyrazy DNA z wykorzystaniem sztucznej inteligencji**

Poszukiwanie inhibitorów z wykorzystaniem wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji przeprowadzono we współpracy z Laboratorium Modelowania Molekularnego Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk (dr Rafał Bachorz)<sup>97</sup>. Model wytrenowano na podstawie znanych inhibitorów gyrazy DNA (351 z bazy ChEMBL i 108 z bazy BindingDB) z wykorzystaniem modelu regresyjnego opartego o sztuczną inteligencję. Na podstawie wytrenowanego modelu przeszukano bazę ChEMBL i zidentyfikowano 333 potencjalnych inhibitorów. Zastosowano dwa podejścia do kryteriów odcięcia: 1) na podstawie prawdopodobieństwa aktywności >75% oraz predykcji IC<sub>50</sub> z regresora <50 000 nM (14 związków); 2) na podstawie prawdopodobieństwa aktywności >50% oraz predykcji IC<sub>50</sub> z regresora <20 000 nM (18 związków). Możliwych do zamówienia było osiem związków (Suplement Tab. S4).

## **3.3 Bakteriologia**

### **3.3.1 Szczepy bakteryjne i hodowla**

Hodowle szczepów *Escherichia coli* prowadzono na podłożu Luria-Bertani płynnym lub stałym (z dodatkiem 1,5% agaru) przez 24 godziny w temperaturze 37°C.

W przypadku hodowli *E. coli* (Tab. 3.1) w celu nadprodukcji białek, namnażanie prowadzono w zmiennych warunkach w zależności od białka.

Hodowle szczepów *M. tuberculosis* (Tab. 3.1) prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z dodatkiem 10% OADC (kwas oleinowy, albumina, dekstroza, katalaza) oraz 0,05% Tween 80 w temperaturze 37°C przez 5-14 dni. Hodowlę na podłożu stałym prowadzono z wykorzystaniem podłoża Middlebrook 7H10 z dodatkiem 10% OADC i 0,5% glicerolu w temperaturze 37°C przez 3-4 tygodnie.

W zależności od przeprowadzanego eksperymentu do podłoży dodawano odpowiednie stężenia antybiotyków lub innych substancji (Materiały i metody 3.3.2).

Tabela 3.1 Wykaz szczepów bakteryjnych wykorzystanych w pracy

Szczep	Charakterystyka	Źródło
<i>E. coli</i> TOP10	F', <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)$ , 7697 <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (StrR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F', <i>ompT</i> , <i>hsdSB(rB-mB-)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), pRARE (CamR).	Novagen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLySs Star	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> , ( <i>rB-mB-</i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>rne131</i> (DE3), pLysS (CamR)	Invitrogen
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Szczep referencyjny, linia filogenetyczna 4	Instytut Biologii Medycznej PAN
<i>M. tuberculosis</i> $\Delta gyrA/attB::gyrA$	Szczep z delecją genu <i>gyrA</i> w miejscu natywnym i jego komplementacją w miejscu <i>attB</i> .	Niniejsza praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i> $\Delta gyrB/attB::gyrB$	Szczep z delecją genu <i>gyrB</i> w miejscu natywnym i jego komplementacją w miejscu <i>attB</i> .	Niniejsza praca doktorska
<i>M. tuberculosis</i> $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ; $\Delta gyrB/attB::gyrB$ z szeregiem mutacji punktowych	Mutacje punktowe analizowane w ramach pracy doktorskiej.	Niniejsza praca doktorska

### 3.3.1 Podłoża mikrobiologiczne i substancje dodawane do podłoż

Podłoże LB (ang. lysogeny broth) płynne

Składnik	Stężenie
chlorek sodu	1%
trypton	1%
ekstrakt drożdżowy	0,5%

Podłoże LB stałe

Składnik	Stężenie
chlorek sodu	1%
trypton	1%
ekstrakt drożdżowy	0,5%
agar	1,5%

Podłoże do autoindukcji płynne

Składnik	Stężenie
trypton	1%
ekstrakt drożdżowy	0,5%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25mM
NH <sub>4</sub> Cl	50mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5mM
α-laktoza	0,2%
glukoza	0,05%
glicerol	0,5%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2mM
mieszanina pierwiastków śladowych (50μM FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 20mM CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 10mM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O, 10mM ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 2mM CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 2mM CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 2mM NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 2mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O, 2mM Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> , 2mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0,02%

Podłoże Middlebrook 7H9 płynne

Składnik	Stężenie
Middlebrook 7H9 (Difco)	0,47%
Tween 80	0,05%
OADC (Becton Dickinson)	10%

Podłoże Middlebrook 7H10 stałe

Składnik	Stężenie
Middlebrook 7H10 (Difco)	1,9%
glicerol	0,5%
OADC (Becton Dickinson)	10%

Wykaz antybiotyków dodawanych do podłoży

antybiotyk	<i>E. coli</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Ampicylina	100 µg/ml	-
Chloramfenikol	34 µg/ml	-
Kanamycyna	50 µg/ml	25 µg/ml
Higromycyna B	200 µg/ml	50 µg/ml
Gentamycyna	10 µg/ml	10 µg/ml

Inne substancje dodawane do podłoży

Substancja	Stężenie w podłożu
X-gal	50 µg/ml
IPTG	1 mM
sacharoza	2%
witamina B <sub>12</sub>	0,5 – 10 µg/ml

### 3.3.2 Przygotowanie komórek kompetentnych

Komórki kompetentne *E. coli* przygotowywano według protokołu Green i Rogers (2013)<sup>98</sup> z niewielkimi zmianami. Czas inkubacji komórek bakteryjnych w roztworach z chlorkiem rubidu został wydłużony kolejno do 30 minut i 2 godzin.

Komórki kompetentne *M. tuberculosis* przygotowywano według protokołu zamieszczonego w „Mycobacteria Protocols” Parish i Roberts (2015)<sup>99</sup>.

### 3.3.3 Transformacja

Transformację komórek *E. coli* przeprowadzano metodą szoku cieplnego. Komórki kompetentne inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie dodawano do 100 µg plazmidowego DNA i dalej inkubowano 30 minut. W celu wniknięcia DNA przez błonę, komórki umieszczano w 42°C na 90 sekund i ponownie schładzano. Kolejno dodawano 500 µl podłoża płynnego LB i inkubowano jedną godzinę w 37°C w celu namnożenia transformantów. Zawiesinę wysiewano na podłoże stałe LB z dodatkiem odpowiednich czynników selekcyjnych.

Transformację komórek *M. tuberculosis* przeprowadzano metodą elektroporacji według protokołu zamieszczonego w „Mycoabcteria Protocols” Parish i Roberts, (2015)<sup>99</sup> przy impulsie elektrycznym o napięciu 2,5 kV, pojemności elektrycznej 25 µF i oporze 1000 Ω.

### 3.3.4 Ocena poziomu wrażliwości szczepów *M. tuberculosis*

Ocena poziomu wrażliwości szczepów *M. tuberculosis* została przeprowadzana z wykorzystaniem metody mikrorozcieńczeń na 96-dołkowych płytkach i testu Alamar Blue (ang. microplate Alamar Blue assay, MABA) jako wskaźnika zahamowania aktywności komórek. Hodowlę szczepów *M. tuberculosis* prowadzono na podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC/Tween do OD<sub>600</sub> 0.8-1, a następnie rozcieńczano do uzyskania gęstości komórek równej 1 w skali McFarlanda, którą dalej rozcieńczano stukrotnie. Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną наносzono w objętości 100 µl do studzienek płytki 96-dołkowej zawierających 100 µl podłoża płynnego z różnymi stężeniami (8 – 0,0156 µg/ml) fluorochinolonów: 2 generacji – ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), 3 generacji: lewofloksacyny (LFX) oraz 4 generacji: moksyfloksacyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX) lub gepotidacyny (GEP) związku z grupy NBTI w stężeniu (25 – 0,195 µg/ml). Kontrolę stanowiło podłoże płynne oraz

hodowla bakteryjna bez dodatku antybiotyków. Płytkę inkubowano przez 7 dni w temperaturze 37°C. Po tym czasie dodawano 30 µl roztworu 0,02% resazuryiny i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, a następnie oceniano minimalne stężenie związków (ang. minimal inhibitory concentration, MIC) hamujące wzrost szczepów *M. tuberculosis* na podstawie zdolności do redukcji niebieskiej resazuryiny, do różowej resorufiny przez aktywne komórki. Ocena wartości MIC została wykonana w minimum trzech powtórzeniach biologicznych i dwóch technicznych.

Dodatkowo dla wybranych szczepów *M. tuberculosis* charakteryzujących się zwiększonym poziomem oporności lub wrażliwości przeprowadzono analizę wrażliwości na fluorochinolony w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prątka, Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. W tym celu hodowlę szczepów *M. tuberculosis* prowadzono na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC. Następnie przygotowywano zawiesinę bakteryjną badanego szczepu w soli fizjologicznej za pomocą moździerzy. Hodowlę rozcieńczano do uzyskania gęstości komórek równej 0,5 w skali McFarlanda, a następnie 100 µl zawiesiny dodawano do 11 ml podłoża płynnego Middlebrook 7H9/OADC. Tak przygotowaną zawiesinę bakteryjną наносono w objętości 100 µl do studzienek płytki 96-dołkowej typu V zawierających 100 µl podłoża płynnego z różnymi stężeniami fluorochinolonów (8 – 0,004 µg/ml). Po okresie 2-4 tygodni (w zależności od wzrostu kontroli pozytywnej – hodowla bez dodatku związku) oceniano wartości MIC na podstawie obecności lub braku osadu komórkowego w odpowiednich dołkach płytki.

### **3.3.5 Ocena stężenia moksyflokscyny wykazującego efekt bakteriobójczy**

Dla szczepów wykazujących wzrost poziomu lekooporności ocenie poddano również wartości minimalnego stężenia moksyflokscyny potrzebnego do zabicia >99% bakterii (ang. minimal bactericidal concentration, MBC). W tym celu hodowlę wybranych szczepów *M. tuberculosis* w logarytmicznej fazie wzrostu rozcieńczano do OD<sub>600</sub>=0,1 w objętości 10 ml, dodawano wybrane stężenia moksyflokscyny (0,05 – 1,6 µg/ml) i inkubowano w 37°C. W czasie 0 (start hodowli) oraz po 7 i 14 dniach dokonywano pomiarów OD<sub>600</sub> z różnymi stężeniami moksyflokscyny oraz wysiewano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC i inkubowano 4 tygodnie w temperaturze 37°C w celu określenia wartości jednostek koloniotwórczych (ang. colony forming unit, CFU). Wartości MBC zostały ustalone na podstawie stosunku liczby kolonii podczas hodowli

z wybranym stężeniem moksyflokscyny do liczby kolonii w hodowli bez inhibitora. Eksperyment został wykonany w trzech powtórzeniach.

### 3.3.6 Analiza tempa wzrostu szczepów *M. tuberculosis*

Tempo wzrostu szczepów *M. tuberculosis* zostało ocenione na podstawie gęstości optycznej przy OD<sub>600</sub>. Hodowlę szczepów *M. tuberculosis* w logarytmicznej fazie wzrostu rozcieńczano do OD<sub>600</sub>=0,1 w objętości 10 ml i inkubowano w 37°C. Następnie dokonywano pomiaru wartości OD<sub>600</sub> na spektrofotometrze w siedmiu punktach czasowych: 48, 72, 96, 120, 144, 216 i 264 godzin. Krzywe regresji dopasowano wykorzystując model regresji nieliniowej, logistycznej uwzględniającej fazy wzrostu bakterii. Otrzymane wyniki analizowano pod kątem obecności różnic statystycznych pomiędzy szczepami w danych punktach czasowych wykorzystując test t dla prób niesparowanych w oprogramowaniu GraphPad Prism 10.

## 3.4 Biologia molekularna

### 3.4.1 Syntetyczne oligonukleotydy

Tabela 3.2 Sekwencje oligonukleotydydowe wykorzystane w celu konstrukcji plazmidów wymaganych do przygotowania modelu genetycznego *M. tuberculosis*.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Zastosowanie
Rv-gyrA-GR1- KpnI	CGGTACCTGGCAACGATGT GGTGCGATC	Amplifikacja fragmentu 5' <i>gyrA</i> z sekwencją powyżej genu
Rv-gyrA-GR2- HindIII	GAAGCTTTCTCCTGCTCGAT GTCAACCGG	
Rv-gyrA-GR3- HindIII	CAAGCTTGACGTCAGCGAC GAGGATTTGATC	Amplifikacja fragmentu 3' <i>gyrA</i> z sekwencją poniżej genu
Rv-gyrA-GR4- ScaI	CAGTACTCCGACTCTCAAA ACATTAGTCCCGG	
Rv-gyrB-GR1- natKpnI	TTAGCGCCGATTTGCCGTTG	Amplifikacja fragmentu 5' <i>gyrB</i> z sekwencją powyżej genu
Rv-gyrB-GR2- HindIII	GAAGCTTGATAGACGCAGC GCCGTATTCGT	

Rv-gyrB-GR3- HindIII	GAAGCTTGTGACCCGGAAT TCGCATACTCC	Amplifikacja fragmentu 3' <i>gyrB</i> z sekwencją poniżej genu
Rv-gyrB-GR4- ScaI	CAGTACTAGTCACCCCGAC TCCTAACACTCGT	
Gm-sen-HindIII	CAAGCTTGGGCAATCAGGT GCGACAATCTATC	Amplifikacja fragmentu DNA kodującego gen oporności na gentamycynę
Gm-rev-HindIII	GAAGCTTACAGGAATCGAA TGCAACCGGC	
PmetE-XbaI-F	CTCTAGAGTAGGCGGCCAT GTCAGCGG	Amplifikacja fragmentu DNA kodującego sekwencję promotorową <i>metE</i>
PmetE-NdeI- HindIII-R	CAAGCTTCCATATGCTGTCC TTCGATCGACGGGTGG	
Rv-gyrA-NdeI- F	CCATATGACAGACACGACG TTGCCGCC	Amplifikacja fragmentu DNA kodującego podjednostkę A gyrazy DNA ( <i>gyrA</i> )
Rv-gyrA-ClaI-R	CATCGATCGGGCGAGCCTG ATTAATTGC	
Rv-gyrB-Pown- XbaI-F	CTCTAGAATGGTGCTCGGC CAGTGGTCT	Amplifikacja fragmentu DNA kodującego podjednostkę B gyrazy DNA ( <i>gyrB</i> )
Rv-gyrB- HindIII-R	CAAGCTTCGCAGGGTTGCG TTAGACATCC	

Tabela 3.3 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane do potwierdzenia genotypu szczepów  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ .

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Zastosowanie
Rv-gyrA-GR3- HindIII	CAAGCTTGACGTCAGCGA CGAGGATTTGATC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrA</i> z wewnętrzną delecją w celu potwierdzenia genotypu pojedynczych rekombinantów <i>gyrA</i> (SCO)
Rv-gyrA- HindIII-rev	CAAGCTTAATTGCCCCG TCTGGTCTGCGC	
Rv-gyrB-GR3- HindIII	GAAGCTTGTGACCCGGA TTCGCATACTCC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrB</i> z wewnętrzną delecją w celu

Rv-gyrB- HindIII-R	CAAGCTTCGAACGCAGGG TTGCGTTAGAC	potwierdzenia genotypu pojedynczych rekombinantów <i>gyrB</i> (SCO)
RvgyrAseq-in-3	TATCGCAGCCAGAAACGC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrA</i> oraz sekwencji poniżej genu w celu potwierdzenia komplementacji <i>gyrA</i> w szczepie SCO
pMV306-ClaI- rev	AAGGCCAGTCTTTCGAC TGAG	
Rv-gyrB-GR3- HindIII	GAAGCTTGTGACCCGGAA TTCGCATACTCC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrB</i> oraz sekwencji poniżej genu w celu potwierdzenia komplementacji <i>gyrB</i> w szczepie SCO
pMV306-ClaI- rev	AAGGCCAGTCTTTCGAC TGAG	
BglII-Mtb- gyrA-sen	CAGATCTATGACAGACAC GACGTTGCC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrA</i> oraz sekwencji poniżej genu w celu potwierdzenia genotypu podwójnego rekombinanta (DCO) i delekcji natywnego genu <i>gyrA</i>
Rv-gyrA-down- rev	GGTGCAGTCACCCCGACT CCTAACA	
Rv-gyrB-NcoI-F	GCCATGGCTGCCCAGAAA AAGAAGGCC	Amplifikacja fragmentu genu <i>gyrB</i> oraz sekwencji poniżej genu w celu potwierdzenia genotypu podwójnego rekombinanta (DCO) i delekcji natywnego genu <i>gyrB</i>
Rv-gyrB-down- rev	TGCGCTGCATCTCCTGCTC G	

Tabela 3.4 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane do przygotowania sondy do hybrydyzacji typu Southern blot.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Zastosowanie
Rv-gyrA-probe-F	CAGGTTCTCGGCGACCGACG	Potwierdzenie genotypu mutanta $\Delta gyrA/attB::gyrA$
Rv-gyrA-probe-R	CCGAACACCCTTGGTCTGCCG	
Rv-gyrB-probe-F	GAAGCTTGTGACCCGGAATC GCATACTCC	Potwierdzenie genotypu mutanta $\Delta gyrB/attB::gyrB$
Rv-gyrB-probe-R	CAAGCTTCGAACGCAGGGTTG CGTTAGAC	

Tabela 3.5 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane w celu przeprowadzenia reakcji amplifikacji genów *gyrA* i *gyrB* w czasie rzeczywistym (qPCR).

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Zastosowanie
Rv-RTPCR- <i>gyrA</i> -F	CAACTACCACCCGCACGGCG	Ocena poziomu ekspresji genu <i>gyrA</i>
Rv-RTPCR- <i>gyrA</i> -R	CACCCGGCCGTCGTAGTTAGGG	
Rv-RTPCR- <i>gyrB</i> -F	GTGAGCGCGCGGTTTACACCATCTCA	Ocena poziomu ekspresji genu <i>gyrB</i>
Rv-RTPCR- <i>gyrB</i> -R	CAGATATCGCATACGCGTCCGAGTC	

Tabela 3.6 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane w celu przeprowadzenia mutagenyzy punktowej genu *gyrA*.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Substytucja aa	Mutacja nt
Rv- <i>gyrA</i> -A90V-F	CACGGCGACGTGTCGATCTAC	A90V	GCC>GTG
Rv- <i>gyrA</i> -A90V-R	CGGGTGGTAGTTGCCCAT		
Rv- <i>gyrA</i> -D94C-F	GTCGATCTACTGCAGCCTGGTG CGCATGGCCC	D94C	GAC>TGC
Rv- <i>gyrA</i> -D94C-R	GCGTCGCCGTGCGGGTGG		
Rv- <i>gyrA</i> -D94G-F	TCGATCTACGGCAGCCTGGTGC GC	D94G	GAC>GGC
Rv- <i>gyrA</i> -D94G-R	CGCGTCGCCGTGCGGGTGG		
Rv- <i>gyrA</i> -E131A-F	AGGTACACCGcAGCCCGGCTG	E131A	GAA>GCA
Rv- <i>gyrA</i> -E131A-R	CATCGCCGCCGGTGGGTC		
Rv- <i>gyrA</i> -E131L-F	GAGGTACACCCTAGCCCGGCTG ACCC	E131L	GAA>CTA
Rv- <i>gyrA</i> -E131L-R	ATCGCCGCCGGTGGGTCA		
Rv- <i>gyrA</i> -E131D-F	GAGGTACACCGATGCCCGGCTG A	E131D	GAA>GAT
Rv- <i>gyrA</i> -E131D-R	ATCGCCGCCGGTGGG		
Rv- <i>gyrA</i> -E162Q-F	CCGGGTGCAACAGCCGACGGT	E162Q	GAG>CAG

Rv-gyrA-E162Q-R	CCGTCGTAGTTAGGGATGAAAT CG		
Rv-gyrA-E196D-F	CAACCTGCGTGACCTGGCCGA CG	E196D	GAG>GAC
Rv-gyrA-E196D-R	TGCGGCGGGATATTGGTTGC		
Rv-gyrA-H368F-F	TTACGTTGACTTCCAACCTCGAC GTCATTG	H368F	CAC>TTC
Rv-gyrA-H368F-R	TAGCGGATCAGCTGGTCC		
Rv-gyrA-E447Q-F	GGCCGCACTGCAACGCCAGCG	E447Q	GAA>CAA
Rv-gyrA-E447Q-R	AGGCGCCGCAACTGCATG		
Rv-gyrA-E482D-F	CGCGACGATCTCGCC	E482D	GAA>GAT
Rv-gyrA-E482D-R	CACGATCCCACGCTGC		

Tabela 3.7 Sekwencje oligonukleotydydowe wykorzystane w celu przeprowadzenia mutagenyzy punktowej genu *gyrB*.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Substytucja AA	Mutacja nt
Rv-gyrB-G22S-F	CATTCTCGAAAGCCTGGAGGCC GTC	G22S	GGG>AGC
Rv-gyrB-G22S-R	GTGATAGACGCAGCGCCG		
Rv-gyrB-E24D-F	AAGGGCTGGACGCCGTCCGCA	E24D	GAG>GAC
Rv-gyrB-E24D-R	CGAGAATGGTGATAGACGCAGC		
Rv-gyrB-G41A-F	GGTGAGCGCGCTTTACACCAT	G41A	GGT>GCT
Rv-gyrB-G41A-R	GGTCGAGCCAATGTACATG		
Rv-gyrB-G41S-F	CGGTGAGCGCAGTTTACACCA	G41S	GGT>AGT
Rv-gyrB-G41S-R	GTCGAGCCAATGTACATG		
Rv-gyrB-E48D-F	TCATTTGGGACGTGGTTCGACAAC	E48D	GAG>GAC
Rv-gyrB-E48D-R	GATGGTGTAACCGCGCT		
Rv-gyrB-E48Q-F	TCTCATTTGGCAGGTGGTCGACA ACGCGGT	E48Q	GAG>CAG
Rv-gyrB-E48Q-R	TGGTGTAACCGCGCTCACCGGT CGAGCCA		

Rv-gyrB-G60A-F	GCGATGGCCGCTTATGCAACC	G60A	GGT>GCT
Rv-gyrB-G60A-R	CTCGTCGACCGCGTTGTC		
Rv-gyrB-G60S-F	GGCGATGGCCAGTTATGCAACCA CAGTGAA	G60S	GGT>AGT
Rv-gyrB-G60S-R	TCGTTCGACCGCGTTGTCGACCAC CTCCCAA		
Rv-gyrB-Y114F-F	TCGGACGCGTTTGCATATCTGG	Y114F	TAT>TTT
Rv-gyrB-Y114F-R	GTCGAACTTGCCGCCGGC		
Rv-gyrB-Y114W-F	TCGGACGCGTGGGCGATATCTGG TGG	Y114W	TAT>TGG
Rv-gyrB-Y114W-R	GTCGAACTTGCCGCCGGC		
Rv-gyrB-Y114V-F	CTCGGACGCGGTTGCATATCTG	Y114V	TAT>GTT
Rv-gyrB-Y114V-R	TCGAACTTGCCGCCG		
Rv-gyrB-G118A-F	GCGATATCTGCTGGTCTGCACG	G118A	GGT>GCT
Rv-gyrB-G118A-R	ATACGCGTCCGAGTCGAA		
Rv-gyrB-G122A-F	GGTCTGCACGCAGTCGGCGTGT	G122A	GGC>GCA
Rv-gyrB-G122A-R	ACCAGATATCGCATAACGC		
Rv-gyrB-G122S-F	TGGTCTGCACAGCGTCGGCGT	G122S	GGC>AGC
Rv-gyrB-G122S-R	CCAGATATCGCATAACGC		
Rv-gyrB-G143N-F	CAAGCGCGACAACACTACGAGTGG TCTCAGG	G143N	GGG>AAC
Rv-gyrB-G143N-R	ATCTCGACTTCGAGCCGG		
Rv-gyrB-G168A-F	AAGAAGACGGCGTCAACGGTGC GGTTC	G168A	GGG>GCG
Rv-gyrB-G168A-R	GGTCGGCGCCCCTTGCTT		
Rv-gyrB-D176S-F	GTTCTGGGCCAGCCCCGCTGTTT TCG	D176S	GAC>AGC
Rv-gyrB-D176S-R	CGCACCGTTGACCCCGTC		
Rv-gyrB-R193K-F	CGTCGCCCAGCAAGCTGCAAGAG	R193K	CGG>AAG
Rv-gyrB-R193K-R	GTTTCGAAGTCGATTCCGTG		
Rv-gyrB-D210E-F	ACCTGACCGAGGAGAGGGTGA	D210E	GAC>GAG
Rv-gyrB-D210E-R	TGATGGTCAGCCCCTTGTT		
Rv-gyrB-G256A-F	TATCCGGGTGCCCTGGTGGAC	G256A	GGC>GCC

Rv-gyrB-G256A-R	GTGAAAGGTGCGGCTCTTAAC		
Rv-gyrB-E318D-F	CCCACGAAGACGGCTTCCGCAG CG	E318D	GAG>GAC
Rv-gyrB-E318D-R	TGCCGCCCTCGTGGGTGT	E318D	
Rv-gyrB-K341R-F	ACTGAAGGACCGGGACCCCAAC CTCACC	K341R	AAG>CGG
Rv-gyrB-K341R-R	AGCTTGCGGTCCTTGGCG		
Rv-gyrB-G347N-F	CAACCTCACCAATGACGATATCC GGG	G347N	GGT>AAT
Rv-gyrB-G347N-R	GGGTCCTTGCCTTCAGT		
Rv-gyrB-G347T-F	CAACCTCACCACTGACGATATCC GGG	G347T	GGT>ACT
Rv-gyrB-G347T-R	GGGTCCTTGCCTTCAGT		
Rv-gyrB-G347A-F	CAACCTCACCGCTGACGATATCC	G347A	GGT>GCT
Rv-gyrB-G347A-R	GGGTCCTTGCCTTC		
Rv-gyrB-E352D-F	ATATCCGGGATGGCCTGGCCG	E352D	GAA>GAT
Rv-gyrB-E352D-R	CGTCACCGGTGAGGTTGG		
Rv-gyrB-G353A-F	ATCCGGGAAGCCCTGGCCGCT	G353A	GGC>GCC
Rv-gyrB-G353A-R	ATCGTCACCGGTGAGGTTGG		
Rv-gyrB-G353S-F	TATCCGGGAAAGCCTGGCCGCTG TGATCTC	G353S	GGC>AGC
Rv-gyrB-G353S-R	TCGTCACCGGTGAGGTT GGGGTCCTTGTCC		
Rv-gyrB-K374R-F	GACCAAGACCCGGTTGG GCAACACCGAG	K374R	AAG>CGG
Rv-gyrB-K374R-R	TGGCCCTCGAACTGCGGT		
Rv-gyrB-A420S-F	CCGTATCGCGTCACGTAAGGC	A420S	GCA>TCA
Rv-gyrB-A420S-R	GCTTGCGCCGAGGACACA		
Rv-gyrB-R446C-F	GGCCGATTGCTGTTCCACGGA	R446C	CGT>TGT
Rv-gyrB-R446C-R	AGCTTGCCGGGCAATCCA		
Rv-gyrB-R446H-F	GCCGATTGCCATTCCACGGATC	R446H	CGT>CAT
Rv-gyrB-R446H-R	CAGCTTGCCGGGCAATCC		
Rv-gyrB-R446L-F	GCCGATTGCCTTTCACGGATC	R446L	CGT>CTT

Rv-gyrB-R446L-R	CAGCTTGCCGGGCAATCC		
Rv-gyrB-S447F-F	GATTGCCGTTTCACGGATCCGCG	S447F	TCC>TTC
Rv-gyrB-S447F-R	GGCCAGCTTGCCGGGCAA		
Rv-gyrB-S447Y-F	GATTGCCGTTACACGGATCCGC	S447Y	TCC>TAC
Rv-gyrB-S447Y-R	GGCCAGCTTGCCGGGCAA		
Rv-gyrB-E501D-F	ACACCGACGTTTCAGGCGAT	E501D	GAA>GAC
Rv-gyrB-E501D-R	TCTTTAGCACCCGGTCGATG		
Rv-gyrB-Y524F-F	AAGCTGCGCTTCCACAAGAT	Y524F	TAC>TTC
Rv-gyrB-Y524F-R	GCCGATATCGAACTCGTC		
Rv-gyrB-Q565H-F	TTTTGGCACACCCGCCGCTGT	Q565H	CAA>CAC
Rv-gyrB-Q565H-R	ACACATGCCCGTTCTCGATG		
Rv-gyrB-D584E-F	CATACTCCGAACGCGAGCGCG	D584E	GAC>GAA
Rv-gyrB-D584E-R	CGAATTCCGGGTCACTGCG		
Rv-gyrB-G594A-F	CTGGAGGCGGCGCTGAAGGCC	G594A	GGG>GCG
Rv-gyrB-G594A-R	CAGACCGTCGCGCTCGCG		
Rv-gyrB-E620Q-F	CGCTAAGCAGTTGTGGGAGA	E620Q	GAG>CAG
Rv-gyrB-E620Q-R	TCCATTTACCTAGACCCTTGTA		
Rv-gyrB-E646Q-F	CGCCGCCGACCAGTTGTTCTCCA	E646Q	GAG>CAG
Rv-gyrB-E646Q-R	TC GCGGCGTCGTCCAGCGTC		

Tabela 3.8 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane w celu amplifikacji fragmentów zmutowanych genów *gyrA* i *gyrB* oraz sekwencjonowania metodą Sangera.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	sprawdzana substytucja	produkt amplifikacji [pz]
seqA-1F	GCAGCTACATCGACTATGCGA	GyrA A90V, D94G, D94C, E162Q, E131A, E131L, E131D, E196D	637
seqA-4R	TGGGATCCGACGATCAGTC		
seqA-2F	TGGCAACCAATATCCCGC	GyrA H368F	643
seqA-3R	TCGAGCGCTTTAACCAGG		
seqA-3F	ATGCTAGCGATCGTCGACG	GyrA E447Q, E482D	926

seqA-2R	AGGTTGACCGCCACGATT		
seqB-0F	GTGCGATCGCTAAAGATCA	GyrB G22S, E24D	697
seqB-5R	AGACCACCAGATATCGCATA		
seqB-1F	ATTCTCGAAGGGCTGGAGG	GyrB G41A, G41S, E48D, E48Q, G60A, G60S, Y114F, Y114W, Y114V, G118A, G122A, G122S, G143N, G168A, D176S	543
seqB-4R	GAACGCCATCTCTTGCAGC		
seqB-2F	TGTTTTCGAAACCACGGAA	GyrB R193K, D210E, G256A, E318D, E318Q, K341R, G347N, G347T, G347A, E352D, G353A, G353S, K374R, A420S, R446C, R446H, R446L, S447F, S447Y	524
seqB-3R	CTTCCCGGATATCGTCACC		
seqB-4F	ACGTAAGGCACGAGAGTTGG	GyrB E501D, Q565H, Y524F, D584E, G594A, E620Q	699
seqB-1R	CCCATCAGGATGGAGAACAA		
seqB-5F	ACGTAAGGCACGAGAGTTGG	GyrB E646D	822
seqB-0R	TCGATCGTACGCTAGTTAAC		

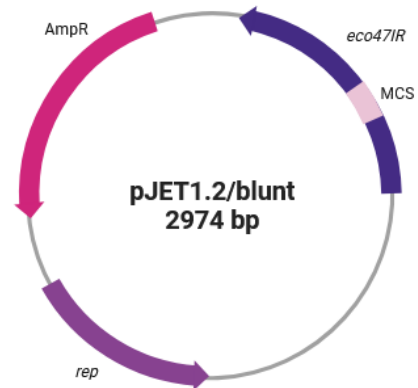
Tabela 3.9 Sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane do przygotowania plazmidu o zwiększonej ekspresji genu *gyrA*.

Nazwa	Sekwencja 5' - 3'	Zastosowanie
BglII_Mtb_gyrA_sen	CAGATCTATGACAGACACGAC GTTGCCG	Amplifikacja <i>gyrA</i> na matrycy plazmidu do integracji pMV306 z wklonowanym genem
HindIII_Mtb_gyrA_rev	CAAGCTTAATTGCCCGTCTGGT CTGCG	

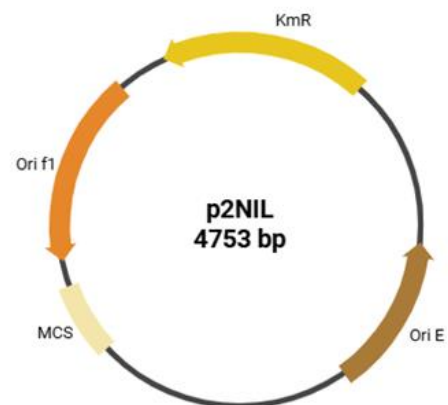
### 3.4.2 Wektory plazmidowe

#### Wykorzystane wektory plazmidowe:

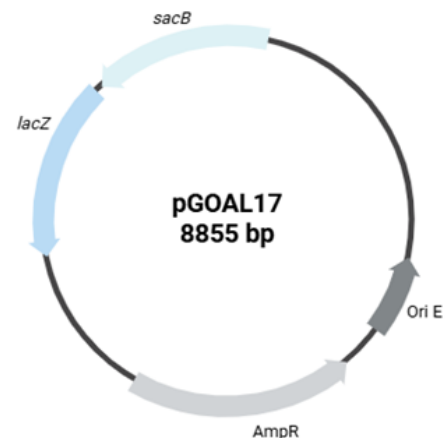
pJET 1.2/blunt – wektor służący do klonowania produktów amplifikacji. Zawiera gen: *bla* warunkujący oporność na ampicylinę, *rep* niezbędny do replikacji w komórkach *E. coli* oraz miejsce polilinkerowe, MCS (ang. multi-cloning site) w obrębie genu samobójczego *eco47IR* (Thermo Scientific).



p2NIL – wektor rekombinacyjny, niereplikujący u mykobakterii. Zawiera gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę, Ori E - miejsce inicjacji replikacji u *E. coli*, miejsce MCS oraz bakteriofagowy system replikacji Ori f1<sup>100</sup>.



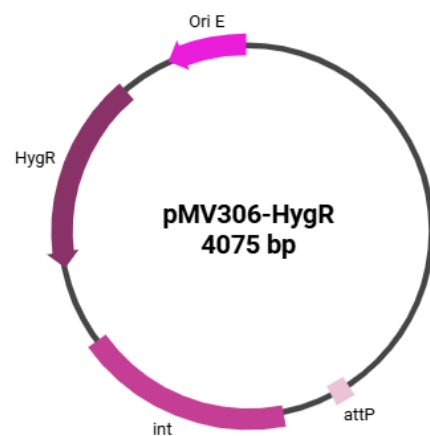
pGOAL17 – wektor posiadający kasetę markerową zawierającą geny: *sacB* i *lacZ* oraz gen *bla* warunkujący oporność na ampicylinę, Ori E - miejsce inicjacji replikacji u *E. coli*<sup>100</sup>.



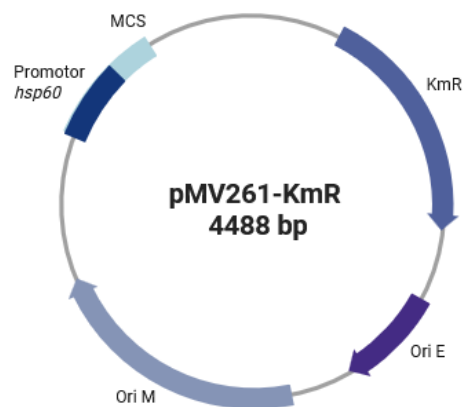
pMV306-KmR – wektor integracyjny umożliwiający rekombinację miejscowo-specyficzną, posiadający gen integrazy mykobakteriofaga L5 (*int*), *aph* warunkujący oporność na kanamycynę, miejsce inicjacji replikacji u *E. coli* (Ori E) oraz miejsce *attP* (Med-Immune Inc.).



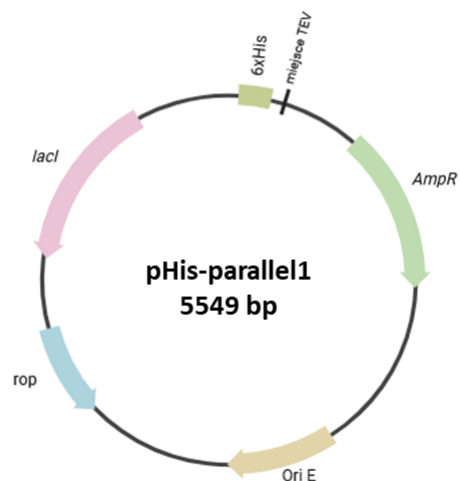
pMV306-HygR – wektor integracyjny umożliwiający rekombinację miejscowo-specyficzną, posiadający gen integrazy mykobakteriofaga L5 (*int*), *hph* warunkujący oporność na higromycynę, miejsce inicjacji replikacji u *E. coli* (Ori E) oraz miejsce *attP* (Med-Immune Inc.).



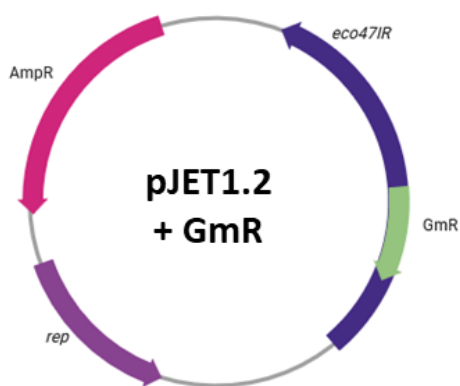
pMV261-KmR – wektor posiadający promotor genu *hsp60*, gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę, miejsca inicjacji replikacji u *E. coli* i u mykobakterii (Ori E i Ori M) oraz miejsce MCS (Med-Immune Inc.).



pHis-parallel1 – wektor umożliwiający ekspresję genów pod promotorem T7 w celu nadprodukcji białek z metką histydynową, posiadający gen warunkujący oporność na ampicylinę<sup>101</sup>.



pJET1.2/blunt + GmR – wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym genem oporności na gentamycynę. (dostępny w Pracownia Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*, IBM PAN).



### Wektory skonstruowane w niniejszej pracy:

- Wektory plazmidowe do rekombinacji homologicznej *M. tuberculosis*:

pDZ1	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem 5' genu <i>gyrA</i> i sekwencją powyżej genu.
pDZ2	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem 5' genu <i>gyrB</i> i sekwencją powyżej genu.
pDZ3	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem 3' genu <i>gyrA</i> i sekwencją poniżej genu.
pDZ4	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem 3' genu <i>gyrB</i> i sekwencją poniżej genu.
pDZ5	Wektor p2NIL z wklonowanym fragmentem 5' genu <i>gyrA</i> i sekwencją powyżej genu.

pDZ6	Wektor p2NIL z wklonowanym fragmentem 5' genu <i>gyrB</i> i sekwencją powyżej genu.
pDZ7	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z wewnętrzną delecją.
pDZ8	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrB</i> z wewnętrzną delecją.
pDZ9	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z wewnętrzną delecją oraz kasetą gentamycynową pomiędzy fragmentami genu <i>gyrA</i> .
pDZ10	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrB</i> z wewnętrzną delecją oraz kasetą gentamycynową pomiędzy fragmentami genu <i>gyrB</i> .
pDZ11	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z wewnętrzną delecją, kasetą gentamycynową oraz genami markerowymi <i>lacZ</i> i <i>sacB</i> .
pDZ12	Wektor p2NIL z wklonowanym genem <i>gyrB</i> z wewnętrzną delecją, kasetą gentamycynową oraz genami markerowymi <i>lacZ</i> i <i>sacB</i> .

- Wektory plazmidowe do rekombinacji miejscowo-specyficznej *M. tuberculosis*:

pDZ13	Wektor pJET1.2/blunt noszący sekwencję promotorową <i>metE</i> .
pDZ14	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym genem <i>gyrA</i> .
pDZ15	Wektor pMV306-HygR z wklonowaną sekwencją promotorową genu <i>metE</i> .
pDZ16	Wektor pMV306-HygR z wklonowanym genem <i>gyrA</i> pod promotorem <i>metE</i> .
pDZ17	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym genem <i>gyrB</i> pod promotorem natywnym.
pDZ18	Wektor pMV306-HygR z wklonowanym genem <i>gyrB</i> i jego sekwencją promotorową.

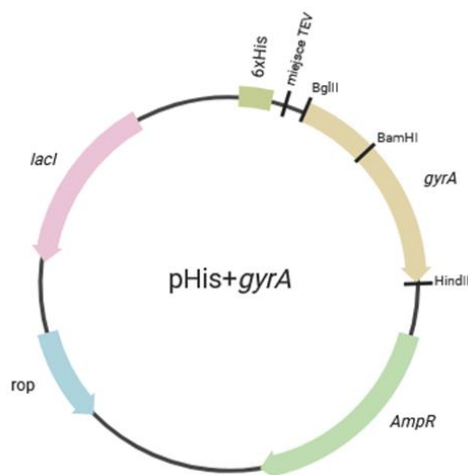
- Wektory plazmidowe wykorzystane do wprowadzenia mutacji w genach gyrazy DNA na drodze rekombinacji miejscowo- specyficznej *M. tuberculosis*:

pDZ19	Wektor pMV306-KmR z wklonowanym genem <i>gyrA</i> i sekwencją promotorową <i>metE</i> .
pDZ20	Wektor pMV306-KmR z wklonowanym genem <i>gyrB</i> i sekwencją promotorową <i>metE</i> .

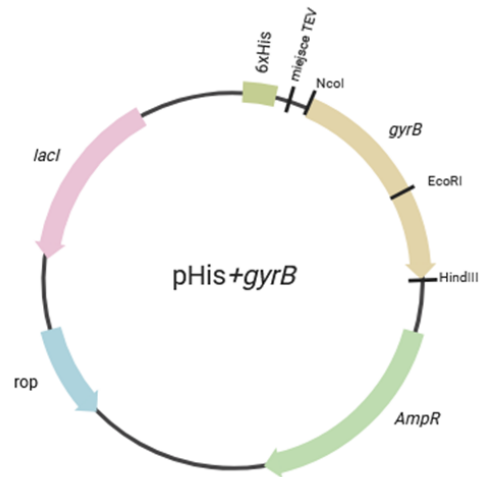
pDZ21-	Wektory pMV306-KmR noszące <i>gyrA</i> z mutacjami punktowymi: A90V,
pDZ31	D94G, D94C, E162Q, E131A, E131L, E131D, E196D H368F E447Q, E482D, otrzymane przez mutagenезę punktową wektora pDZ19.
pDZ32-	Wektory pMV306-KmR noszące <i>gyrB</i> z mutacjami punktowymi: G22S,
pDZ74	E24D, G41A, G41S, E48D, E48Q, G60A, G60S, Y114F, Y114W, Y114V, G118A, G122A, G122S, G143N, G168A, D176S, R193K, D210E, G256A, E318D, E318Q, K341R, G347N, G347T, G347A, E352D, G353A, G353S, K374R, A420S, R446C, R446H, R446L, S447F, S447Y, E501D, Q565H, Y524F, D584E, G594A, E620Q, E646D, otrzymane przez mutagenезę punktową wektora pDZ20.
pDZ75	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z mutacją E131A.
pDZ76	Wektor pMV261-KmR z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z mutacją E131A.
pDZ77	Wektor pMV306-KmR z wklonowanym genem <i>gyrA</i> z mutacją E131A pod kontrolą promotora <i>hsp60</i> .

- Wektory plazmidowe do nadprodukcji białek GyrA oraz GyrB:

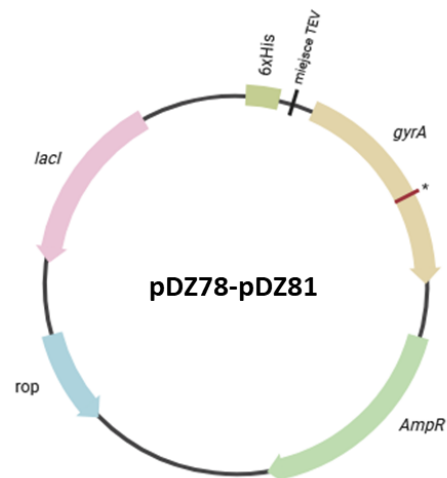
Plazmid pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrA* (uzyskany podczas realizacji pracy magisterskiej).



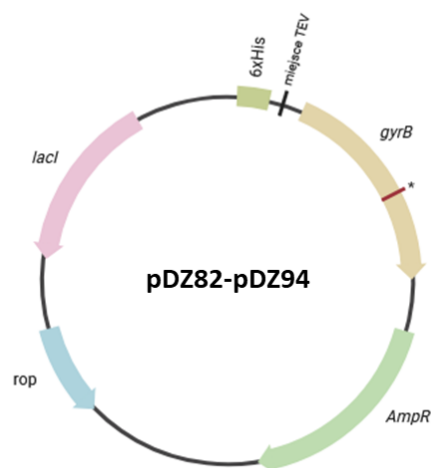
Plazmid pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrB* (uzyskany podczas realizacji pracy magisterskiej).



pDZ78-pDZ81: plazmidy pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrA* z substytucjami: A90V, D94C, D94G, E131A. Otrzymane przez mutagenezę punktową plazmidu z genem bez mutacji.



pDZ82-pDZ94: plazmidy pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrB* z substytucjami: G41A, E48D, Y114F, G122A, G347N, G353A, R446C, R446H, R446L, S447F, S447Y, E501D, Q565H. Otrzymane przez mutagenezę punktową plazmidu z genem bez mutacji.



### **3.5 Techniki wykorzystywane podczas pracy z DNA**

#### **3.5.1 Izolacja plazmidowego DNA**

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System firmy Promega zgodnie z protokołem opracowanym przez producenta.

#### **3.5.2 Izolacja chromosomalnego DNA**

Genomowy DNA z hodowli *M. tuberculosis* izolowano z zastosowaniem metody mechanicznej dezintegracji komórek. Hodowlę z podłoża stałego zawieszano w 200 µl buforu TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA) z kulkami cyrkoniowymi o średnicy 0,1 mm. Następnie dokonywano mechanicznej dezintegracji z wykorzystaniem aparatu FastPrep-24 (MP Biomedicals) - dwa razy po 45 sekund, przy prędkości 6 m/s, a następnie lizowano przez dodanie 200 µl DNA-zolu. W celu oczyszczenia DNA z zanieczyszczeń białkami dodawano 200 µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1 i inkubowano 10 min na lodzie. Kolejno wirowano (10 minut, 13000 x g, 4°C), przenoszono warstwę wodną zawierającą DNA do nowej probówki i precypitowano przez dodanie trzech objętości 96% etanolu i 1/10 objętości 5 M octanu potasu. Po 15 minutach inkubacji na lodzie, ponownie wirowano i osad DNA przemywano 70% etanolem. Ostatecznie DNA zawieszano w 200 µl wody i trawiono 20 µg RNAzy A przez 30 minut w temperaturze 37°C w celu usunięcia zanieczyszczeń RNA.

#### **3.5.3 Amplifikacja DNA**

Amplifikację genów lub fragmentów DNA przez łańcuchową reakcję polimerazy przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy DNA zależnej od DNA AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) według zaleceń producenta. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną o składzie:

100 ng DNA

1 µM odpowiednich starterów

1x stężony bufor reakcyjny

1 µl polimerazy Pfx

w objętości całkowitej 50  $\mu$ l i po 2 minutach wstępnej denaturacji w 95°C, mieszaninę poddawano 35 cyklom kolejnej denaturacji (95°C, 30 sekund), przyłączania starterów (50-65°C, 30 sekund), wydłużania (68°C, 1 minuta / 1 kb). Ostatnim etapem było końcowe wydłużanie fragmentów w 68°C przez 15 minut.

W przypadku amplifikacji krótkich fragmentów DNA, do potwierdzania poprawności wprowadzonej mutacji stosowano ALLin Taq Mastermix (highQu). Przygotowywano mieszaninę reakcyjną:

100 ng DNA

1x stężony Mastermix

0,1  $\mu$ M odpowiednich starterów

w objętości całkowitej 25  $\mu$ l i po 1 minucie wstępnej denaturacji w 95°C, mieszaninę poddawano 40 cyklom kolejnej denaturacji (95°C, 15 sekund), przyłączania starterów (55-64°C, 15 sekund), wydłużania (72°C, 15 sekund / 1kb).

#### **3.5.4 Trawienie enzymami restrykcyjnymi**

Trawienie enzymami restrykcyjnymi (Thermo Fisher) wykonywano zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **3.5.5 Łączenie fragmentów DNA**

Łączenie fragmentów DNA wykonywano z wykorzystaniem ligazy T4 (Thermo Fisher) zgodnie wytycznymi producenta.

#### **3.5.6 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym**

Elektroforezę poziomą w 1% żelu agarozowym przeprowadzano w buforze TAE w obecności 0,4  $\mu$ g/ml bromku etydyny lub żel wybarwiano w bromku etydyny po rozdziale elektroforetycznym w zależności od przeprowadzanego eksperymentu. Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, przy napięciu 5-10 V/cm w zależności od eksperymentu. Wizualizacji dokonywano z wykorzystaniem transilluminatora przy długości fali UV  $\lambda=320$  nm lub systemu do detekcji i analizy Imager2 (VWR) oraz ChemiDoc Image System (BioRad). Dla oceny długości fragmentów DNA wykorzystywano wzorec wielkości: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher).

### 3.5.7 Elucja fragmentów DNA z żelu agarozowego

Elucję DNA z 1% żelu agarozowego przeprowadzano przy użyciu zestawu komercyjnego QIAGEN II Gel Extraction Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami opracowanymi przez producenta.

### 3.5.8 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie fragmentów DNA przeprowadzano metodą Sangera z wykorzystaniem sekwenatora Genetic Analyser 3500/3500xL (Applied Biosystems). Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* przez dr Małgorzatę Korycką-Machałę.

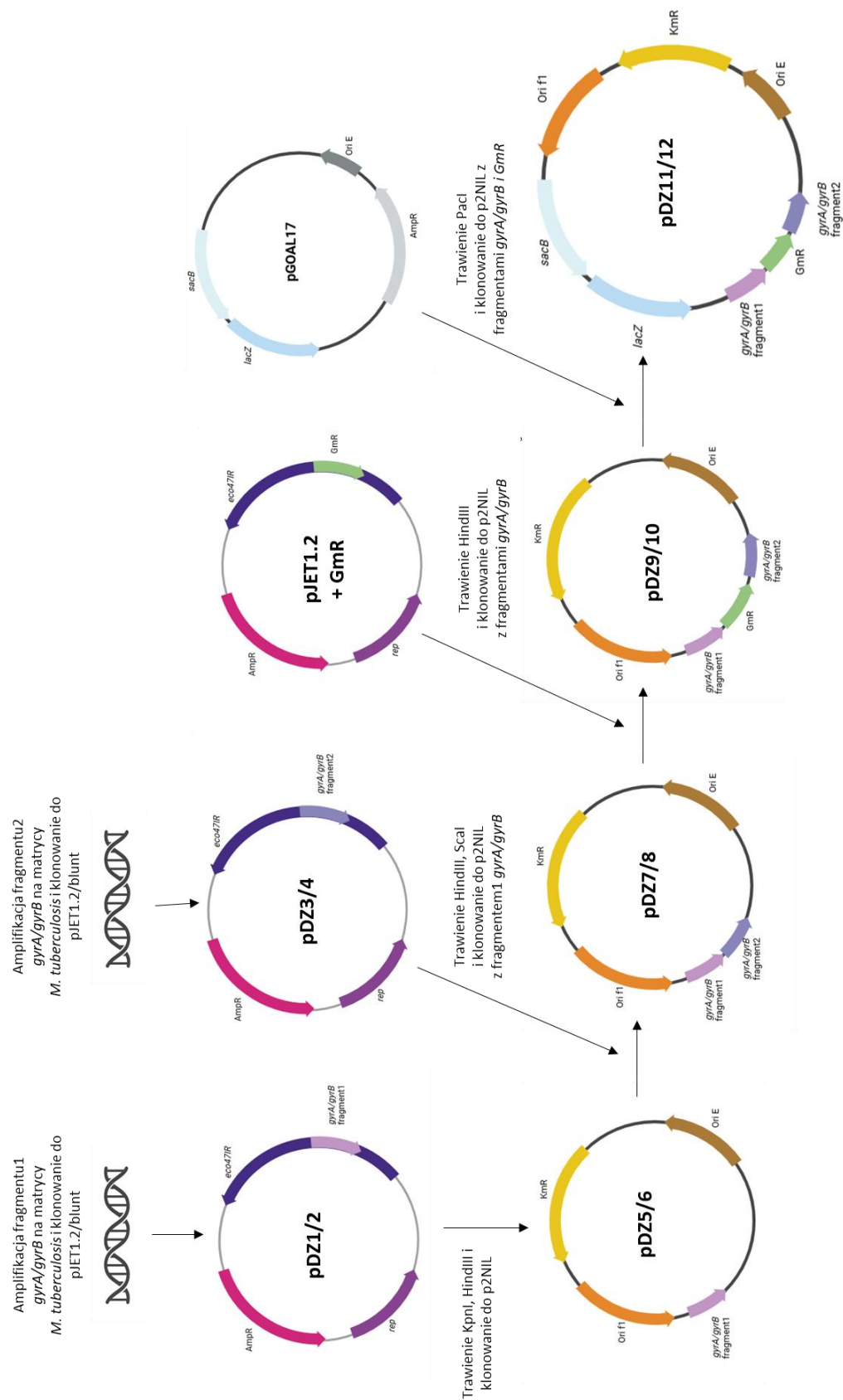
Sekwencjonowanie całogenomowe szczepów *M. tuberculosis* przeprowadzono metodą nanoporową z wykorzystaniem urządzenia MinION (Oxford Nanopore Technologies) przez firmę genXone.

Do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie Geneious Prime.

### 3.5.9 Konstrukcja plazmidów i szczepów *M. tuberculosis*

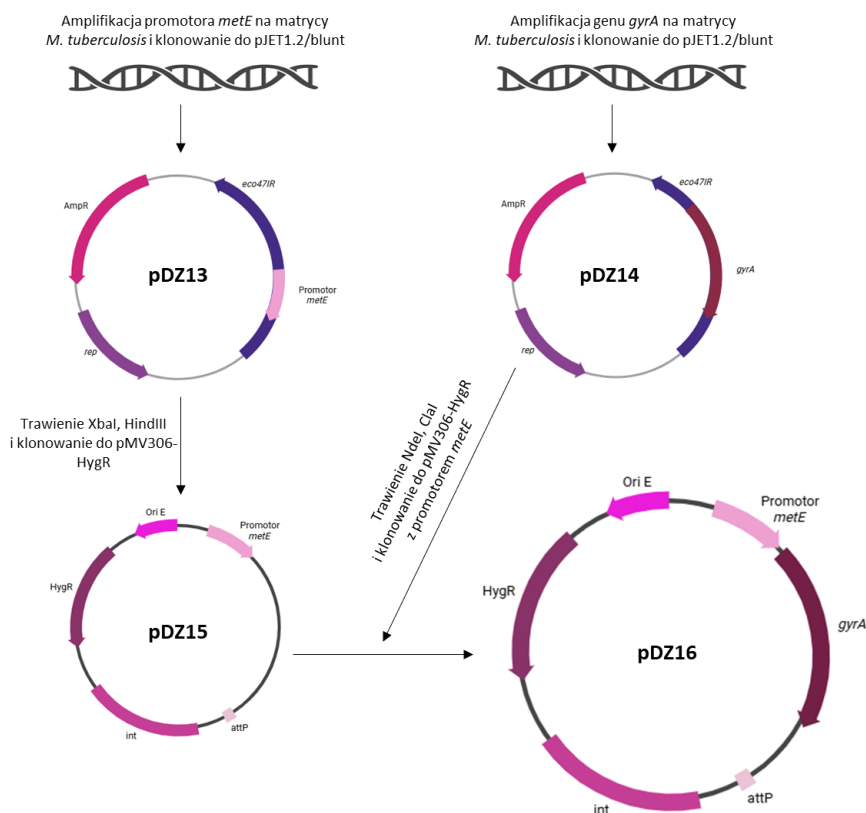
- Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej

W pierwszym etapie z wykorzystaniem sekwencji oligonukleotydowych (Tab. 3.2) amplifikowano fragmenty DNA powyżej końca 5' (fragment1) i poniżej końca 3' (fragment2) genu poddawanego delecji (*gyrA* lub *gyrB*). Produkty oczekiwanej wielkości klonowano do wektora pJET1.2/blunt (pDZ1-4). Plazmidy transformowano do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10 i poddawano sekwencjonowaniu celem sprawdzenia poprawności klonowanej sekwencji. Następnie powyższe fragmenty regionów flankujących geny oraz gen warunkujący oporność na gentamycynę, a także kasetę markerową (*lacZ* i *sacB*) z plazmidu pGOAL17 przeklonowano do plazmidu p2NIL. Poprawność klonowanych fragmentów DNA sprawdzano z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych (Tab. 3.2) i rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. Przygotowane w ten sposób plazmidy p2NIL (pDZ11 i pDZ12) z niefunkcjonalnymi genami gyrazy, posłużyły do wymiany natywnych genów *M. tuberculosis* H37Rv na drodze rekombinacji homologicznej (Ryc. 3.1).

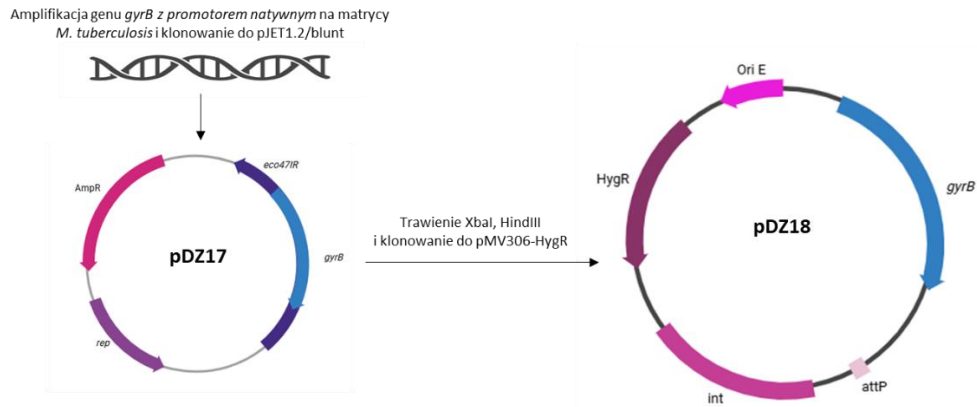


Rycina 3.1 Schemat konstrukcji plazmidów pDZ11 oraz pDZ12 do rekombinacji homologicznej z delecją w genach *gyrA* i *gyrB* *M. tuberculosis*.

W celu przygotowania szczepów prątka gruźlicy pozbawionych natywnych genów gyrazy DNA, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania bakterii, w kolejnym etapie przygotowano plazmidy do komplementacji genów *gyrA* lub *gyrB* w miejscu *attB*. Fragmenty DNA noszące geny *gyrA/gyrB* amplifikowano na matrycy chromosomalnego DNA *M. tuberculosis* H37Rv z wykorzystaniem PCR. Produkty reakcji PCR o odpowiedniej wielkości wklonowano do plazmidu pJET1.2/blunt. Plazmidy transformowano do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10. Poprawność sekwencji nukleotydowej genów została sprawdzona za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Następnie geny przeklonowano do plazmidu pMV306-HygR zawierającego miejsce *attP* i gen warunkujący oporność na higromycynę. Plazmidy zaprojektowano w taki sposób, aby ekspresja genu *gyrB* odbywała się z udziałem promotora natywnego. Natomiast, ze względu na usytuowanie genów w genomie prątka, w przypadku plazmidów zawierających gen *gyrA*, wykorzystano promotor genu *metE*, umożliwiającą ekspresję genu na poziomie zbliżonym do naturalnego. Poprawność klonowania sprawdzano przez trawienia odpowiednimi endonukleazami (Tab. 3.2) i rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (Ryc. 3.2, Ryc. 3.3).



Rycina 3.2 Schemat konstrukcji plazmidu pDZ16 do komplementacji genu *gyrA* pod promotorem *metE*.

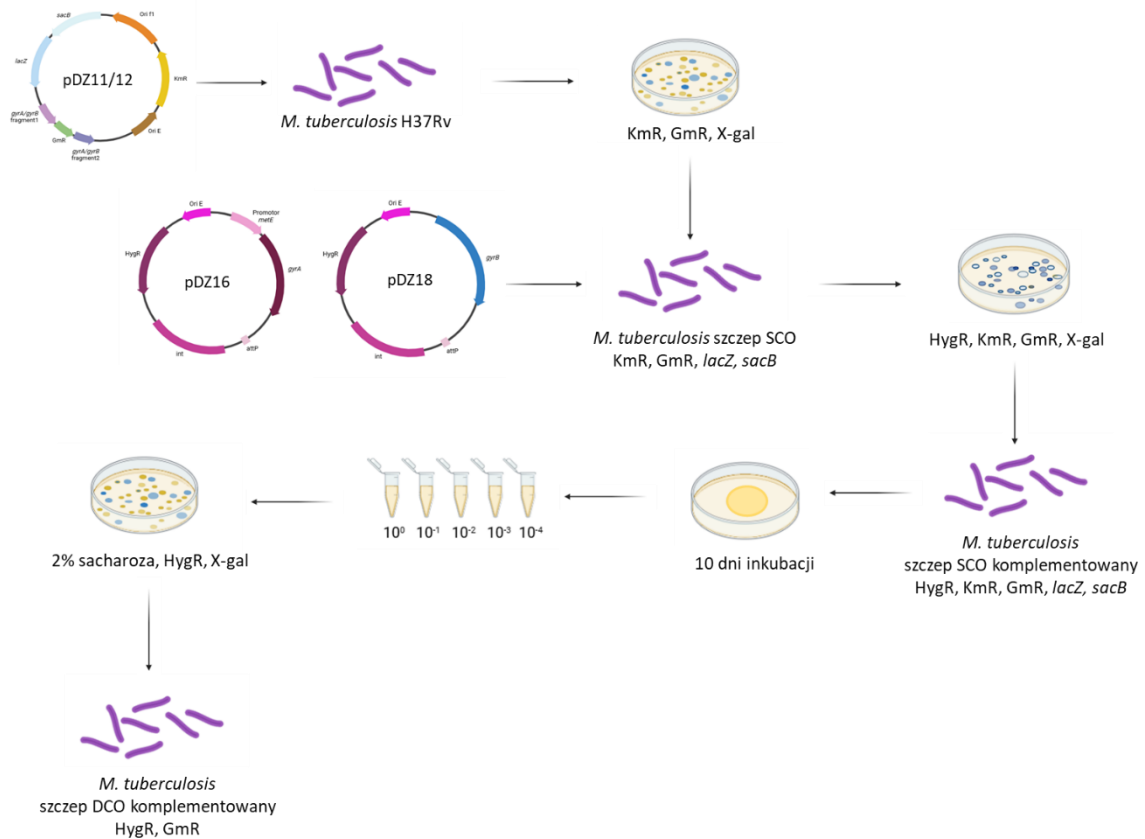


Rycina 3.3 Schemat konstrukcji plazmidu pDZ18 do komplementacji genu *gyrB* pod promotorem natywnym.

- Konstrukcja mutantów SCO i DCO

W pierwszym etapie przeprowadzono elektroporację plazmidu zawierającego niefunkcjonalne geny gyrazy, kasetę gentamycynową oraz geny *lacZ*, *sacB* do komórek kompetentnych *M. tuberculosis* (pDZ11 i pDZ12). Bakterie wysiewano na podłoże z dodatkiem kanamycyny, gentamycyny i X-galu. Po inkubacji (4-6 tygodni, 37°C) otrzymano niebieskie kolonie wykazujące wzrost na podłożu z dodatkiem kanamycyny oraz gentamycyny. W pierwszym etapie rekombinacji homologicznej otrzymano mutanty SCO (ang. single cross-over) posiadające natywne geny gyrazy oraz niefunkcjonalne fragmenty genów. Następnie przeprowadzono elektroporację plazmidów do komplementacji, czyli pMV306-HygR z *gyrA* lub *gyrB* (pDZ16/18) do komórek kompetentnych szczepów SCO *M. tuberculosis*. Bakterie wysiewano na podłoże stałe z dodatkiem higromycyny oraz X-galu. Uzyskano kolonie zdolne do rozkładu X-galu i odporne na higromycynę, kanamycynę i gentamycynę. W ten sposób na drodze rekombinacji miejscowo-specyficznej otrzymano mutanty SCO z komplementacją, noszące natywne, niefunkcjonalne oraz komplementowane geny gyrazy DNA w miejscu *attB* (szczep SCO komplementowany). W kolejnym kroku, otrzymane klony wysiewano na podłoże stałe w dużej gęstości generującej stres, wpływający na zwiększenie częstości pojawiania się mutacji, co umożliwiłoby uzyskanie mutantów DCO (ang. double cross-over). Po inkubacji (10 dni), wykonano szereg rozcieńczeń zawiesiny bakteryjnej i wysiewano na podłoże stałe z dodatkiem 2% sacharozy, X-galu i higromycyny. Uzyskano kolonie niezdolne do rozkładu analogu laktozy, odporne na działanie higromycyny i gentamycyny, ale wrażliwe na kanamycynę. Otrzymano mutanty DCO komplementowane, posiadające

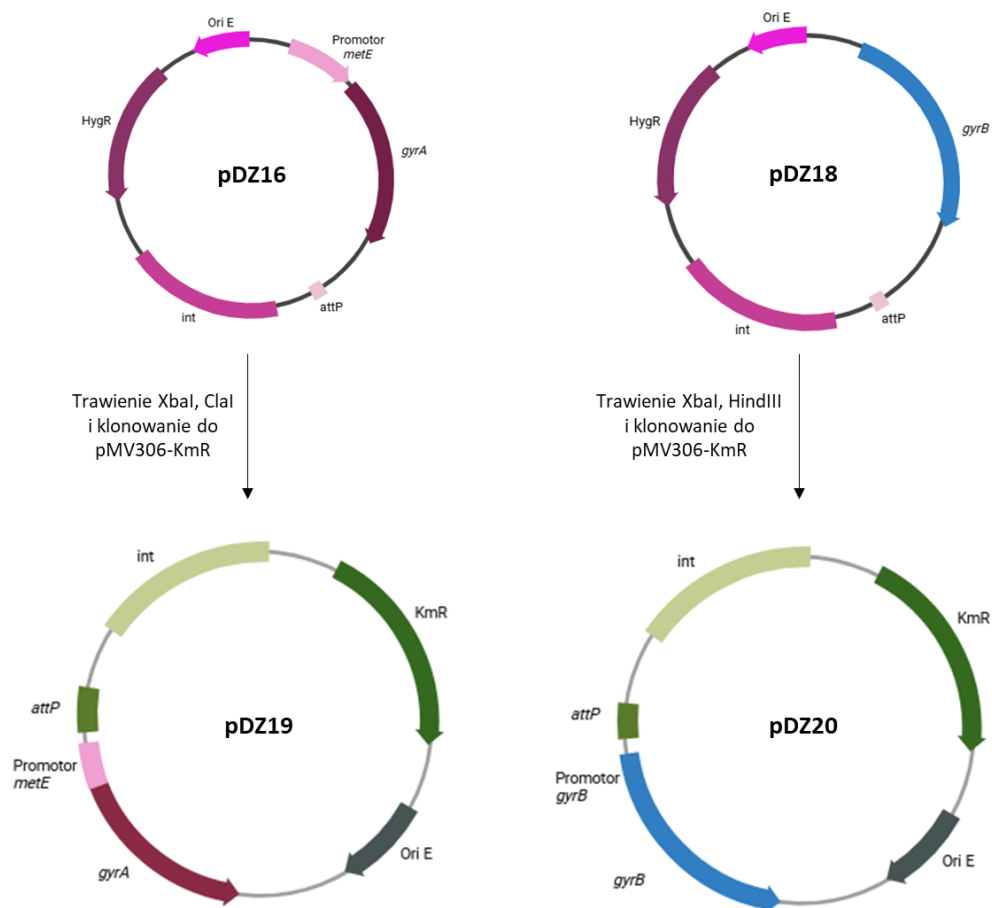
niefunkcjonalne geny gyrazy DNA oraz komplementację odpowiednich genów *gyrA* lub *gyrB* (Ryc. 3.4). Poprawność szczepów sprawdzono przez amplifikację fragmentów chromosomalnego DNA metodą PCR z zastosowaniem odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych (Tab. 3.3) oraz przez hybrydyzację Southern Blot z wykorzystaniem zaplanowanych sond genetycznych (Tab. 3.4).



Rycina 3.4. Schemat otrzymywania mutantów *M. tuberculosis* - DCO komplementowanych, pozbawionych natywnych genów *gyrA* lub *gyrB* z komplementacją odpowiedniego genu. Opracowano z wykorzystaniem programu BioRender.

- Konstrukcja wektorów do wprowadzania mutacji w genach *gyrA/gyrB* *M. tuberculosis* na drodze rekombinacji miejscowo-specyficznej

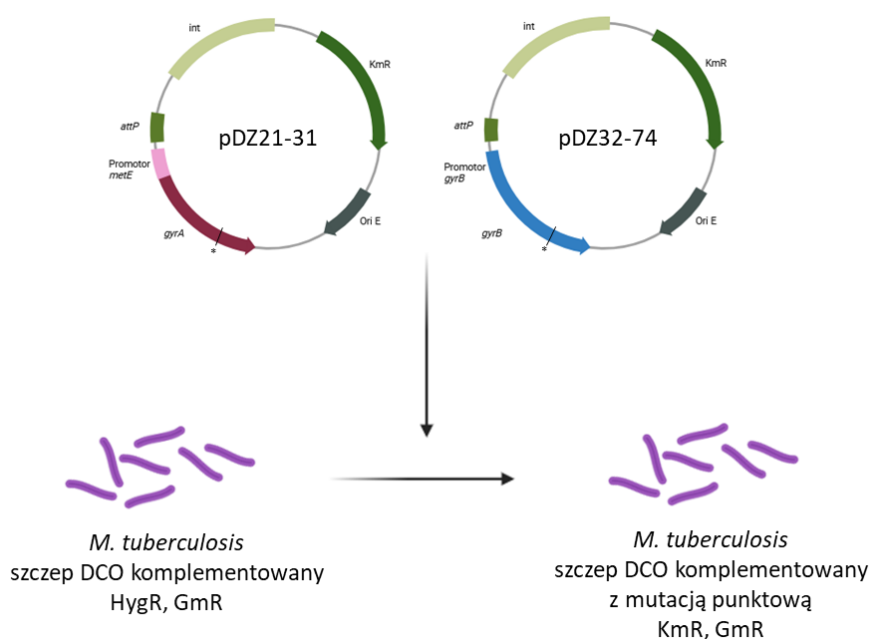
Geny *gyrA* oraz *gyrB* z odpowiednimi promotorami przeklonowano z plazmidów pDZ16 i pDZ18 do pMV306-KmR (Ryc. 3.5), które posłużyły do mutagenazy punktowej w celu otrzymania plazmidów z mutacjami punktowymi (pDZ21-74) i wprowadzenia wybranych mutacji do genomu *M. tuberculosis*.



Rycina 3.5 Schemat konstrukcji plazmidów pDZ19 oraz pDZ20 do integracji genów *gyrA/gyrB* z wybranymi mutacjami.

- Konstrukcja szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi w genach *gyrA* i *gyrB*

W celu otrzymania szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi w genach *gyrA* oraz *gyrB* przeprowadzono elektropolację plazmidów po mutageniezie punktowej (pDZ21-74) do komórek kompetentnych szczepów DCO z komplementacją. Bakterie wysiewano na podłoże z dodatkiem kanamycyny, a obecność mutacji sprawdzano przez amplifikację fragmentu genu *gyrA* lub *gyrB* z wykorzystaniem odpowiednich sekwencji starterowych (Tab. 3.8) i sekwencjonowanie metodą Sangera. W ten sposób na drodze rekombinacji miejscowo-specyficznej do genomu wprowadzano gen gyrazy z mutacją (Ryc. 3.6).

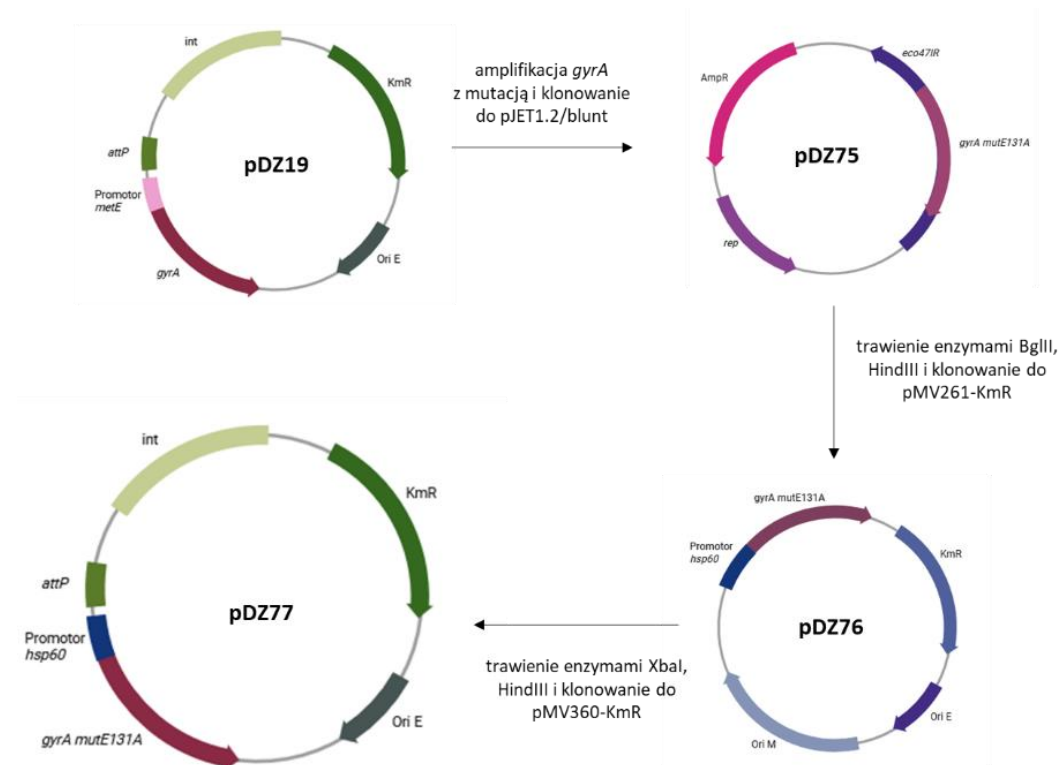


Rycina 3.6 Schemat otrzymywania mutantów *M. tuberculosis*, DCO komplementowanych z mutacją punktową w genach gyrazy DNA.

- Konstrukcja wektora do nadekspresji genu *gyrA*

W celu nadekspresji genu *gyrA* z substytucją E131A (*gyrA* mutE131A) w szczepie *M. tuberculosis* skonstruowano plazmid pMV306Km z wklonowanym zmutowanym genem *gyrA* pod kontrolą promotora *hsp60*. Po amplifikacji genu *gyrA* (Tab. 3.9) na matrycy plazmidu pDZ19 z mutacją w *gyrA* (mutE131A), produkt wklonowano do pJET1.2/blunt. Następnie gen przeklonowano do plazmidu pMV261-KmR z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych BglIII i HindIII. Kolejno *gyrA* mut E131A wraz z promotorem *hsp60* wklonowano do plazmidu pMV306-KmR (pDZ77) (Ryc. 3.7).

Plazmid pDZ77 posłużył do elektroporacji komórek kompetentnych *M. tuberculosis* DCO komplementowanych i uzyskania szczepu ze zwiększoną ekspresją genu *gyrA* z mutacją E131A i opornością na kanamycynę.



Rycina 3.7 Schemat otrzymania plazmidu do nadekspresji: pMV306-KmR z wklonowanym genem *gyrA* z substytucją E131A pod kontrolą promotora *hsp60*.

- Konstrukcja wektorów do nadprodukcji białek

Wektory pHis-parallel1 z wklonowanymi genami *gyrA* lub *gyrB* skonstruowano podczas realizacji pracy magisterskiej pt.: „Gyraza *Mycobacterium tuberculosis* jako tarcza dla leków przeciwprątkowych”. Plazmidy te posłużyły jako matryca do otrzymania plazmidów z wybranymi mutacjami w genach gyrazy DNA oraz dalszej nadprodukcji i oczyszczania białek z substytucjami.

### 3.5.10 Hybrydyzacja techniką Southern blot

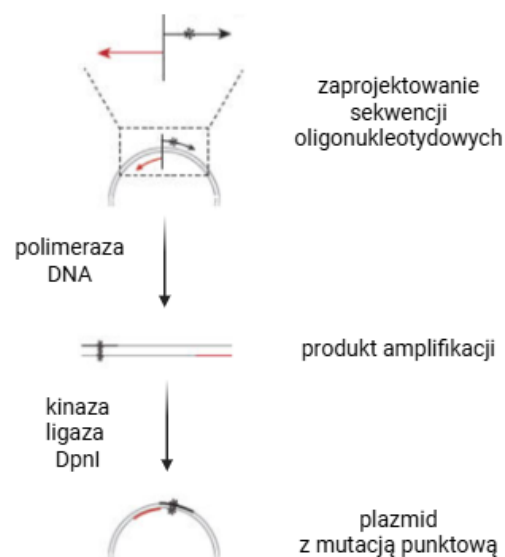
W celu potwierdzenie poprawności genotypu szczepów *M. tuberculosis* SCO, SCO z komplementacją oraz DCO z komplementacją, chromosomalny DNA trawiono za pomocą odpowiednich enzymów restrykcyjnych (PvuII dla *gyrA*; PvuII, HindIII dla *gyrB*) i poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym i transformowano na membranę nylonową zgodnie z zaleceniami producenta (Cytiva).

W celu przygotowania sondy przeprowadzono reakcję amplifikacji fragmentów genu *gyrA* /*gyrB* z odpowiednimi sekwencjami oligonuklotydowymi (Tab. 3.4), a otrzymany

produkt znakowano z wykorzystaniem zestawu ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detecting System (Amersham Biosciences) zgodnie z protokołem opracowanym przez producenta.

### 3.5.11 Mutageneza

Mutagenezę plazmidów pMV306-KmR oraz pHis-parallel1 z wklonowanymi genami *gyrA* lub *gyrB* przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (LabJot) lub w przypadku trudności w uzyskaniu odpowiedniego plazmidu wykorzystywano zestaw komercyjny Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher) zgodnie z procedurą opracowaną przez producenta. Matrycowy plazmid poddawano amplifikacji w obecności zaprojektowanych sekwencji oligonukleotydowych (Tab. 3.6, Tab. 3.7) noszących wybrane mutacje punktowe. Wielkość otrzymanych produktów sprawdzano przez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym, następnie usuwano matrycowy DNA za pomocą enzymu DpnI, fosforylowano końce produktów PCR przez kinazę (w przypadku drugiego zestawu używano fosforylowanych sekwencji oligonukleotydowych) i łączono końce przy udziale ligazy w celu cyrkulizacji plazmidu (Ryc. 3.8). Otrzymany produkt transformowano do komórek kompetentnych *E. coli* TOP10, wysiewano na podłoże selekcyjne LB z kanamycyną. Obecność wprowadzanych mutacji potwierdzano przez sekwencjonowanie metodą Sanger (Tab. 3.8).



Rycina 3.8 Schemat wprowadzania mutacji punktowej i przebiegu mutagenazy. Opracowane na podstawie New England Biolabs i programu BioRender.

### **3.6 Techniki wykorzystywane podczas pracy z RNA**

#### **3.6.1 Izolacja całkowitego RNA**

W celu izolacji całkowitego RNA hodowlę *M. tuberculosis* prowadzono do  $OD_{600}=0,6$  i wirowano (15 minut, 3000 x g, 35°C). Osad komórkowy (z 30 ml hodowli) zawieszano w 300  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O i 900  $\mu$ l odczynnika TRIzol (Zymo Research), a następnie przenoszono do probówek Lysing Matrix (Fisher Scientific) zawierających kulki krzemionkowe. Kolejno prowadzono mechaniczną dezintegrację z wykorzystaniem urządzenia FastPrep-24 przy parametrach dla komórek *Mycobacterium*. Po oddzieleniu supernatantu od kulek dodawano 250  $\mu$ l chloroformu, dokładnie mieszano i inkubowano 10 minut na lodzie. Po odwirowaniu (15 minut, 12000 x g, 4°C) warstwę wodną precypitowano przez dodanie jednej objętości izopropanolu i 1/10 objętości 3M octanu sodu. Dodatkowo w celu uwidocznienia osadu RNA dodawano 1  $\mu$ l GlycoBlue (Invitrogen). Po całonocnej inkubacji w -80°C próbki wirowano (30 minut, 20000 x g, 4°C), osad płukano przez dodanie 500  $\mu$ l 70% etanolu i ponownie wirowano. Po osuszeniu osad RNA zawieszano w 40  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, a następnie 8  $\mu$ g całkowitego RNA trawiono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Turbo DNase (Invitrogen) według protokołu opracowanego przez producenta.

#### **3.6.2 Odwrotna transkrypcja**

W celu otrzymania cDNA przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji dla 10 ng RNA po trawieniu DNazą, za pomocą zestawu komercyjnego SuperScript III FirstStrand Synthesis SuperMix Kit (Invitrogen) według protokołu opracowanego przez producenta.

#### **3.6.3 Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)**

Analiza poziomu ekspresji genów została przeprowadzona z wykorzystaniem qPCR na aparacie QuantStudio 5 (Applied Biosystems). Mieszanina reakcyjna (10  $\mu$ l) składała się z:

10 ng cDNA,

1x stężonego SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems),

po 0,3  $\mu$ M odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych (Tab. 3.5),

a reakcję prowadzono przez wstępna denaturacja w 50°C przez 2 minuty i kolejno w 95°C przez 2 minuty. Następnie próbki poddano 40 cyklom kolejno: denaturacji (95°C przez

15 sekund), przyłączenia starterów (62°C przez 15 sekund) oraz wydłużania z odczytem fluorescencji (72°C przez 1 minutę). W celu oceny specyficzności i czystości produktu amplifikacji przeprowadzono krzywą topnienia (95°C - 15 sekund, 60°C - 1 minuta, 95°C - 15 sekund).

Do oceny poziomu ekspresji genów *gyrA* i *gyrB* wykorzystano gen referencyjny *sigA* kodujący podjednostkę sigma A polimerazy RNA *M. tuberculosis*. Poziom ekspresji genów ustalano poprzez analizę metodą komparatywną  $\Delta\Delta Ct$  (według Livak i Schmittgen, 2001<sup>102</sup>). W celu oceny różnicy poziomu ekspresji badanych genów w stosunku do genu referencyjnego w pierwszym etapie dla każdej próbki wyznaczano wartość  $\Delta Ct$ , czyli różnicę pomiędzy wartością  $Ct$  genu badanego i genu referencyjnego. Kolejno obliczano  $\Delta\Delta Ct$  co stanowiło różnicę pomiędzy  $\Delta Ct$  szczepu badanego i kontrolnego. Następnie wyznaczano względną ekspresję badanego genu na podstawie wartości współczynnika R, który odpowiada  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Otrzymanie wyniku  $>1$  oznacza wzrost ekspresji genu, a przy wartości  $<1$  obserwujemy zmniejszenie ekspresji badanego genu. Analiza została wykonana w trzech powtórzeniach biologicznych oraz w trzech powtórzeniach technicznych.

### **3.6.4 Pomiar stężenia kwasów nukleinowych**

Pomiarów stężenia kwasów nukleinowych dokonywano na urządzeniu NanoDrop ND 100 V3.5.2 metodą spektrofotometryczną.

## **3.7 Techniki wykorzystywane podczas pracy z białkami**

### **3.7.1 Elektroforeza pionowa w żelu poliakrylamidowym**

Elektroforezę pionową przeprowadzano w celu rozdziału białek na podstawie ich masy cząsteczkowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), w dwuwarstwowym żelu poliakrylamidowym, w buforze TGB (1x stężony) przy napięciu 90 V dla żelu zagęszczającego i 120 V dla żelu rozdzielającego. Próbki białek (15  $\mu$ l) obciążano 5  $\mu$ l 4x stężonego buforu Laemmliego, inkubowano przez 10 minut w temperaturze 96°C i nanoszono do studzienek żelu. W celu wizualizacji żełe barwiono przy pomocy odczynnika Instant Blue (Expedeon).

Żele poliakrylamidowe i bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek:

- Żel zagęszczający 4% (4% akrylamid/bisakrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED)
- Żel rozdzielający 12% (12% akrylamid/bisakrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED)
- bufor TGB (25 mM Tris-HCl, 250 mM glicyna, 1% SDS)
- bufor obciążający do rozdzielania elektroforetycznego białek - 4x stężony bufor Laemmliego (0,04% błękit bomofenolowy; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 30% glicerol; 400 mM DTT; 8% SDS).

W celu oceny masy cząsteczkowej białek wykorzystywano marker wielkości mas: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

### 3.7.2 Pomiar stężenia białek

Pomiarów stężenia białek dokonywano na urządzeniu NanoDrop ND 100 V3.5.2 metodą Bradford lub na urządzeniu Thermo Scientific NanoDrop One przez pomiar absorbancji przy długości fali  $\lambda=280$  nm.

### 3.7.3 Nadprodukcja białek

Nadprodukcja podjednostki A gyrazy DNA *M. tuberculosis* (GyrA):

Otrzymane wcześniej plazmidy ekspresyjne pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrA* oraz plazmidy po mutagenie transformowano do komórek *E. coli* Rosetta metodą szoku termicznego. Hodowlę płynną (3 L) w podłożu do autoindukcji z dodatkiem laktozy inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem do osiągnięcia wartości współczynnika gęstości OD<sub>600</sub> wynoszącej od 0,5 do 0,7, a następnie kontynuowano w temperaturze 20°C przez noc. W celu otrzymania osadu komórkowego hodowlę wirowano przez 20 minut, 3700 x g, w 4°C, usuwano supernatant, a osad przechowywano w -80°C.

Nadprodukcja podjednostki B gyrazy DNA *M. tuberculosis* (GyrB):

Otrzymane wcześniej plazmidy ekspresyjne pHis-parallel1 z wklonowanym genem *gyrB* oraz plazmidy po mutagenie transformowano do komórek *E. coli* Rosetta lub w przypadku substytucji G353A do komórek *E. coli* BL21 pLySs Star, metodą szoku

termicznego. Prowadzono hodowlę płynną (1 L) na podłożu LB w temperaturze 37°C z wytrząsaniem do osiągnięcia wartości współczynnika gęstości OD<sub>600</sub> wynoszącej od 0,5 do 0,7. W celu indukcji ekspresji białka do hodowli dodawano analog laktozy - IPTG w stężeniu 1 mM i kontynuowano hodowlę w temperaturze 30°C z wytrząsaniem przez trzy godziny. Hodowlę wirowano przez 20 minut, 3700 x g, w 4°C, a osad przechowywano w -80°C.

### 3.7.4 Oczyszczanie białek przez chromatografię metalopowinowactwa

Oczyszczanie rekombinowanych białek GyrA: Osad otrzymany po nadprodukcji białka rozmrażano i zawieszano w 30 ml buforu do lizy: (50 mM cytrynian sodu, 300 mM NaCl, 40 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, 3% TritonX-100, 10 µg/ml RNaza, 100 µg/ml lizozym, 100 U benzonaza, 0,1% koktajl inhibitorów proteaz, pH 7). Następnie przeprowadzano dezintegrację komórek *E. coli* z wykorzystaniem ultradźwięków przy 30 seriach sonikacji po 9,9 sekundy pulsu i 9,9 sekundy przerwy, przy wartości amplitudy równej 30%. Otrzymaną zawiesinę wirowano w probówkach okrągłodennych przez jedną godzinę, 16000 x g, w 4°C, a supernatant dodatkowo filtrowano za pomocą filtru (o średnicy porów 0,45 µm). Przesącz mieszano ze złożem agarozowym wysyconym jonami niklu HisPur Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) przepłukanym wcześniej 20 ml buforu opłaszczającego (50 mM cytrynian sodu, 300 mM NaCl, 40 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, pH 7) i inkubowano przez 60 minut na rotorze (4°C). Po tym czasie mieszaninę nanoszono na kolumnę i złożę ze związanym białkiem płukano 100 ml buforu opłaszczającego w celu usunięcia zanieczyszczeń. Kolejno białko eluowano przez 10-krotne naniesienie 1 ml buforu do elucji (50 mM cytrynian sodu, 300 mM NaCl, 400 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, pH 7). W ten sposób otrzymywano 10 frakcji, które następnie analizowano za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. Odpowiednie frakcje zatężano przez wirowanie przy 1100 x g, w 4°C z wykorzystaniem koncentratorów wirówkowych z odcięciem 50 kDa masy cząsteczkowej białka.

Oczyszczanie rekombinowanych białek GyrB:

Oczyszczanie białka GyrB przeprowadzono analogicznie do oczyszczania białka GyrA, przy czym wykorzystano odmienne bufony do lizy komórek *E. coli* (20 mM Tris-

HCl, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometrylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, 3% TritonX-100, 10 µg/ml RNaza, 100 µg/ml lizozym, 100 U benzonaza, 0,1% koktajl inhibitorów proteaz, pH 7,5), do opłaszczania białka (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 40 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometrylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, pH 7,5) oraz elucji białka (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol, 10% glicerol, 0,1 mM fluorek fenylometrylosulfonylu, 2 mM 2-merkaptioetanol, pH 7,5).

Oczyszczanie wariantu GyrB z substytucją G353A, którego nadprodukcję uzyskano w *E. coli* BL21 pLySs Star przeprowadzono z wykorzystaniem buforów o takim samym składzie jak dla białek GyrA.

### **3.7.5 Oczyszczanie białek przez chromatografię żelową wykluczenia**

W drugim etapie białka doczyszczano przez filtrację żelową. Zasada działania tej metody polega na wnikanii małych cząsteczek w porowatą strukturę złoża i wykluczaniu dużych cząsteczek, przez co większe cząsteczki są eluowane pierwsze. Filtracja żelowa została przeprowadzona z wykorzystaniem kolumny ze złożem z dekstranu i bisakrylamidu (Sephacryl S-300 HR) oraz systemu do oczyszczania białek ÄKTA start. W pierwszym etapie kolumnę odpłukano z 20% etanolu i kalibrowano odpowiednim buforem przy przepływie 0,5 ml na minutę przez noc. Dla białek GyrA oraz GyrB G353A wykorzystano bufor składający się z 50 mM cytrynianu sodu, 300 mM chlorku sodu i 10% glicerolu. Dla białek GyrB wykorzystano bufor o składzie: 20 mM Tris-HCl, 500 mM chlorek sodu i 10% glicerol. Bufory uprzednio filtrowano i odgazowano przy pomocy pompki wodnej i łaźni ultradźwiękowej. Po kalibracji, na kolumnę nanoszono 800 µl białka uzyskanego po oczyszczeniu metodą chromatografii metalopowinowactwa i eluowano przy przepływie 1 ml na minutę. Po upływie około 30 minut, gdy obserwowano wzrost absorbancji, zbierano frakcje białek, które następnie analizowano z wykorzystaniem żeli SDS-PAGE. Frakcje zawierające białko o odpowiedniej masie cząsteczkowej koncentrowano z wykorzystaniem koncentratorów wirówkowych 50 kDa. Po zakończeniu elucji, kolumnę i system do oczyszczania białek przepłukiwano dejonizowaną wodą oraz 20% etanolem.

### **3.7.6 Przygotowanie białka bez metki histydynowej**

W celu oceny tworzenia kompleksów białka GyrA z białkiem GyrB z substytucjami należało otrzymać preparat białka GyrA bez metki histydynowej do testu pull-down. Po

nadprodukcji GyrA oraz oczyszczaniu przez chromatografię metalopowinowactwa do oczyszczonego preparatu białka dodawano proteazę TEV (oczyszczoną przez pracowników Ghilarov Lab, John Innes Centre) w stosunku 100:1. Następnie przeprowadzono dializę przez noc w 4°C w buforze do dializy (50 mM cytrynian sodu, 80 mM chlorek sodu, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Kolejno białko poddano chromatografii jonowymiennej, którą przeprowadzono z wykorzystaniem systemu AKTA Go i kolumny HiTrap Q FF. W pierwszej kolejności kolumnę kalibrowano przez przepłukanie buforem A bez chlorku sodu (50 mM cytrynian sodu, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7) i nanoszono białko. Następnie płukano 5% buforu B o wysokim stężeniu soli (50 mM cytrynian sodu, 1 M chlorek sodu, 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7) w celu odpłukania zanieczyszczeń, czyli białek o punkcie izoelektrycznym wyższym od pH buforu, eluowano białko GyrA bez metki histydynowej w gradiencie stężenia soli (buforu B) od 5-50%. Otrzymane frakcje analizowano w żelach SDS-PAGE, a próbki z białkiem GyrA doczyszczano przez zastosowanie chromatografii żelowej wykluczenia i koncentrowano.

### **3.7.7 Ocena struktury III-rzędowej białek**

W celu sprawdzenia prawidłowego sfałdowania białek przeprowadzono analizę nanoDSF z wykorzystaniem systemu PrometheusPanta (NanoTemper). Próbki białek po oczyszczeniu rozcieńczano do osiągnięcia stężenia 1 mg/ml i wirowano 10000 x g przez 10 minut. Następnie około 10 µl próbki nanoszono do szklanych kapilar w dwóch powtórzeniach technicznych i umieszczano w kasecie urządzenia. Stabilność termiczną analizowano przez pomiar fluorescencji przy długości fali 330 i 350 nm i rozproszenie światła w funkcji temperatury w zakresie 20-95°C (1°C/min).

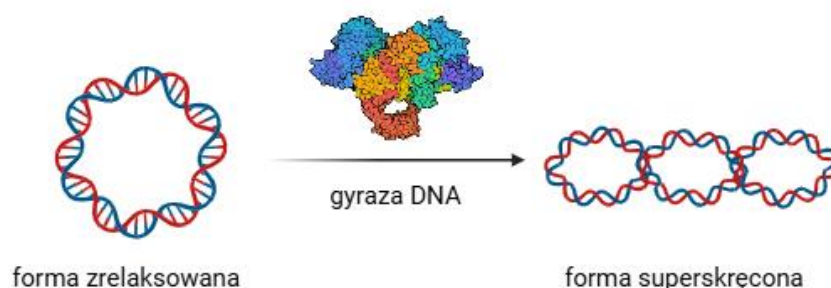
## **3.8 Testy *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanych białek**

### **3.8.1 Test zdolności gyrazy do superskręcania DNA**

W celu oceny aktywności gyrazy DNA *M. tuberculosis* oraz wpływu moksyflokscyny na działanie enzymu przeprowadzono test zdolności enzymu do wprowadzania negatywnych superskrętów w DNA plazmidowym (Ryc. 3.9). W pierwszym etapie ustalano jedną jednostkę aktywności białka (1 U). Przygotowywano mieszaninę reakcyjną (30 µl) składającą się z:

- 0,5  $\mu\text{l}$  zrelaksowanego DNA plazmidowego pBR322 o stężeniu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Inspiralis),
- 6  $\mu\text{l}$  5x stężonego buforu reakcyjnego (końcowe stężenie: 10 mM HEPES, 1,2 mM octanu magnezu, 0,8 mM DTT, 0,4 mM spermidyny, 1 mM ATP, 20 mM glutaminianu potasu, 0,01 mg/ml acetylowanej albuminy),
- 20,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O,
- 3  $\mu\text{l}$  enzymu w wybranym stężeniu

i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie reakcję hamowano przez dodanie 30  $\mu\text{l}$  buforu STEB (40% glicerol, 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA, 0,5 mg/ml błękit bromofenolowy) i 30  $\mu\text{l}$  mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1 (v:v). Mieszaninę reakcyjną wytrząsano przez 5 sekund i wirowano przez 2 minuty przy 14000 x g. Następnie 20  $\mu\text{l}$  fazy wodnej nanoszono na 1% żel agarozowy o wysokiej rozdzielczości, pozostawiano na 20 minut inkubacji w celu poprawy rozdzielczości i stabilizacji próbek w studzienkach żelu, a następnie poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu przez trzy godziny przy napięciu 50 V. Po zakończeniu rozdziału żel barwiono w roztworze 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bromku etydyny przez godzinę, odpłukiwano w wodzie przez 5 minut i wizualizowano przy użyciu systemu do detekcji i analizy Imager2 (VWR). Jedną jednostkę aktywności enzymu oceniano jako najmniejsze badane stężenie białka zdolne do całkowitego skręcenia zrelaksowanego substratu DNA na podstawie obrazów żelów agarozowych.



Rycina 3.9 Schemat reakcji superskręcania DNA w obecności gyrazy DNA *M. tuberculosis*. Opracowanie z wykorzystaniem programu BioRender.

W celu oceny stężenia moksyflokscyny hamującego aktywność gyrazy, przygotowywano mieszaninę reakcyjną (30  $\mu$ l) składającą się z:

- 0,5  $\mu$ l zrelaksowanego DNA plazmidowego pBR322 o stężeniu 1  $\mu$ g/ $\mu$ l (Inspiralis),
- 6  $\mu$ l 5x stężonego buforu reakcyjnego,
- 17,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O,
- 3  $\mu$ l enzymu o stężeniu odpowiadającemu 10 U (1U w mieszaninie reakcyjnej),
- 3  $\mu$ l moksyflokscyny w wybranym stężeniu

i postępowano w analogiczny sposób jak przy ustalaniu jednej jednostki aktywności. Otrzymane wyniki analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Aktywność gyrazy oceniano jako stosunek ilości formy superskręconej przy danym stężeniu inhibitora do ilości formy superskręconej plazmidu przy braku inhibitora i przeliczano na procent aktywności. Eksperyment wykonywano w trzech powtórzeniach. Następnie oceniano stężenie moksyflokscyny, przy którym obserwowano 50% zahamowanie zdolności gyrazy do wprowadzania superskrętów (IC<sub>50</sub>, ang. half maximal inhibitory concentration). Otrzymane dane analizowano z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 10 wykorzystując regresję nieliniową, czteroparametrową przy zależności procentowej aktywności enzymu od logarytmu ze stężenia inhibitora.

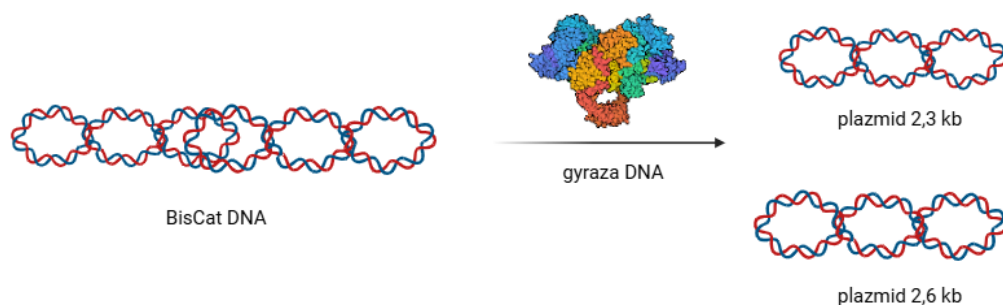
### 3.8.2 Test dekatencji DNA

W celu oceny zdolności gyrazy do rozplatania i rozdzielania splecionych cząsteczek plazmidowego DNA przeprowadzono test dekatencji DNA (Ryc. 3.10). Początkowo ustalano jedną jednostkę aktywności gyrazy przez przygotowanie mieszaniny reakcyjnej (30  $\mu$ l) składającej się z:

- 1  $\mu$ l dwóch superskręconych, pojedynczo połączonych, kolistych cząsteczek DNA o wielkości 2,3 kb i 2,6 kb – BisCat DNA (Inspiralis) o stężeniu 200 ng/ $\mu$ l,
- 6  $\mu$ l 5x stężonego buforu reakcyjnego (końcowe stężenie 40 mM Tris-HCl, 6 mM octan magnezu, 10 mM DTT, 10 mM chlorek sodu, 1 mM ATP, 250 mM glutaminian potasu, 0,5 mg/ml acetylowana albumina),

- 20  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O,
- 3  $\mu\text{l}$  enzymu o odpowiednim stężeniu

i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Kolejno reakcję hamowano przez dodanie 30  $\mu\text{l}$  buforu STEB i 30  $\mu\text{l}$  mieszaniny chloroform:alkohol izoamyłowy (24:1, v:v). Po intensywnym wytrząsaniu (5 sekund) i zwirowaniu (2 minuty, 14000 x g) próbek, 20  $\mu\text{l}$  fazy wodnej nanoszono do studzienek 1% żelu agarozowego o wysokiej rozdzielczości z dodatkiem bromku etydyny. Po 20 minutach inkubacji prowadzono rozdział elektroforetyczny przez 90 minut przy napięciu 80 V w obecności 0,4  $\mu\text{g/ml}$  bromku etydyny. Otrzymany wynik wizualizowano przy pomocy systemu Imager2 (VWR). Otrzymane obrazy żeli analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Aktywność enzymu oceniano jako procent dekatencji, czyli stosunek ilości DNA po dekatencji w stosunku do całkowitej ilości DNA (form pojedynczych plazmidów i splecionego substratu) po przeliczeniu na procenty. Eksperyment wykonywano w trzech powtórzeniach. Jedną jednostkę aktywności enzymu ustalano przy aktywności 95% lub wyższej.



Rycina 3.10 Schemat reakcji dekatencji DNA w obecności gyrazy DNA *M. tuberculosis*. Opracowanie z wykorzystaniem programu BioRender.

W kolejnym etapie oceniano wpływ moksyflokscyny na aktywność białka. W tym celu przygotowywano mieszaninę reakcyjną (30  $\mu\text{l}$ ) składającą się z:

- 1  $\mu\text{l}$  BisCat DNA (Inspiralis) o stężeniu 200 ng/  $\mu\text{l}$ ,
- 6  $\mu\text{l}$  5x stężonego buforu reakcyjnego,
- 17  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O,

- 3  $\mu$ l enzymu o stężeniu odpowiadającemu 10 U,
- 3  $\mu$ l moksyflokscyny w wybranym stężeniu

i postępowano w analogiczny sposób jak przy ustalaniu jednej jednostki aktywności enzymu. W analizie densytometrycznej z wykorzystaniem programu ImageJ oceniano procent aktywności enzymu (stosunek form pojedynczych plazmidów do całkowitej ilości DNA) w obecności szeregu stężeń inhibitora – moksyflokscyny. Eksperyment wykonywano w trzech powtórzeniach. Do oceny wartości  $IC_{50}$  wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism 10 wykorzystując regresję nieliniową czteroparametrową przy zależności procentowej aktywności enzymu od logarytmu ze stężenia inhibitora.

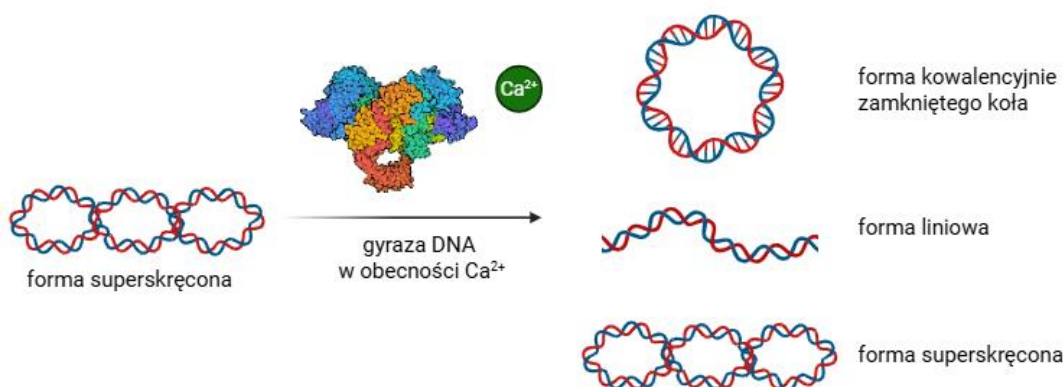
### 3.8.3 Test rozszczepienia łańcucha DNA przez gyrazę

W celu oceny zdolności gyrazy do przecinania plazmidowego DNA przeprowadzono test rozszczepienie łańcucha DNA (ang. cleavage assay) (Ryc. 3.11). W pierwszym etapie, aby uwidocznić tę aktywność gyrazy, test przeprowadzono w obecności jonów wapnia zamiast magnezu, co zapobiega ponownemu łączeniu nici DNA przez enzym. Przygotowano mieszaninę reakcyjną (30  $\mu$ l) składającą się z:

- 0,5  $\mu$ l superskręconego DNA plazmidowego pBR322 (Inspiralis) o stężeniu 1  $\mu$ g/  $\mu$ l,
- 6  $\mu$ l 5x stężonego buforu reakcyjnego (o końcowym stężeniu 50 mM HEPES, 100 mM glutaminian potasu, 4 mM DTT, 2 mM spermidyna, 1 mM ATP, 0,1 mg/ml acetylowana albumina, 4 mM chlorek wapnia),
- 3  $\mu$ l drożdżowego ekstraktu tRNA o stężeniu 1 mg/ml,
- 17,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O,
- 3  $\mu$ l odpowiedniego stężenia enzymu

i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C. Następnie w celu uwolnienia DNA z kompleksu enzym-DNA dodawano 3  $\mu$ l 2% roztworu SDS oraz 3  $\mu$ l proteiny K w stężeniu 1 mg/ml i ponownie inkubowano przez 30 minut w 37°C. Reakcję hamowano przez dodanie 30  $\mu$ l buforu STEB i 30  $\mu$ l mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24:1, v:v). Po dokładnym wymieszaniu próbek (5 sekund) i zwirowaniu (2 minuty,

14000 x g), 20  $\mu\text{l}$  fazy wodnej nanoszono do studzienek 1% żelu agarozowego i po 20 minutach inkubacji prowadzono rozdział elektroforetyczny przez jedną godzinę przy napięciu 90V w obecności 0,4  $\mu\text{g/ml}$  bromku etydyny. Wyniki wizualizowano z wykorzystaniem systemu ChemiDoc Image System (BioRad) i analizowano densytometrycznie z wykorzystaniem oprogramowania ImageJ. Procent aktywności rozszczepiania łańcucha DNA został wyznaczony jako stosunek ilości formy liniowej DNA do całkowitej ilości DNA w danej linii żelu i przedstawiony w postaci procentów. Eksperyment wykonywano w trzech powtórzeniach. Na podstawie testu w obecności jonów wapnia wybrano stężenia białek do dalszych testów z inhibitorem.



Rycina 3.11 Schemat przedstawiający reakcję rozszczepienia łańcucha plazmidowego DNA przez gyrazę DNA w obecności jonów wapnia. Opracowano z wykorzystaniem programu BioRender

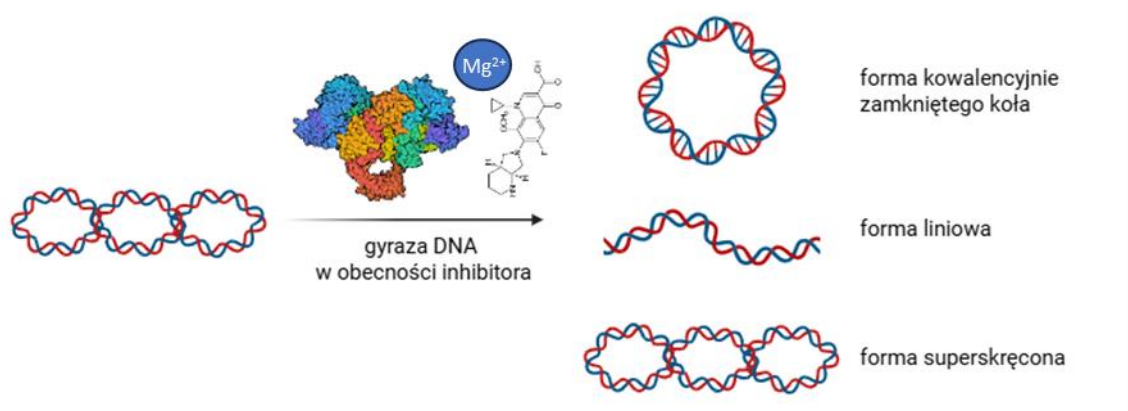
W celu uwidocznienia mechanizmu działania moksyflokscyny, tj. stabilizacji dwuniciowych pęknięć DNA przeprowadzono test w obecności inhibitora i jonów magnezu (Ryc. 3.12). Przygotowano mieszaninę reakcyjną (30  $\mu\text{l}$ ) składającą się z:

- 0,5  $\mu\text{l}$  superskręconego DNA plazmidowego pBR322 (Inspiralis) o stężeniu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,
- 6  $\mu\text{l}$  5x stężonego buforu reakcyjnego (o końcowym stężeniu 50 mM HEPES, 100 mM glutaminian potasu, 4 mM DTT, 2 mM spermidyna, 1 mM ATP, 0,1 mg/ml acetylowana albumina, 6 mM octan magnezu),
- 3  $\mu\text{l}$  drożdżowego ekstraktu tRNA o stężeniu 1 mg/ml,
- 14,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O,

- 3  $\mu\text{l}$  odpowiedniego stężenia enzymu,

- 3  $\mu\text{l}$  moksyflokscyny o stężeniu z zakresu 0,5-1000  $\mu\text{M}$ ,

a następnie postępowano w analogiczny sposób jak przy teście w obecności jonów wapnia: inkubowano (30 minut, 37°C), dodawano SDS i proteinazę K, ponownie inkubowano (30 minut, 37°C) i poddawano rozdzielni elektroforetycznemu. Otrzymane żełe wizualizowano z wykorzystaniem ChemiDoc Image System i poddawano analizie densytometrycznej w celu oceny poziomego cięcia DNA (stosunek formy liniowej do całkowitego DNA, przedstawiony w procentach) w obecności różnych stężeń inhibitora. Eksperyment wykonywano w trzech powtórzeniach. Do oceny wartości moksyflokscyny przy którym obserwowano 50% maksymalnej aktywności wprowadzania cięć DNA ( $\text{CC}_{50}$  ang. cytotoxic concentration) wykorzystano oprogramowanie GraphPad Prism 10 wykorzystując regresję nieliniową czteroparametrową przy zależności procentowej aktywności enzymu od logarytmu ze stężenia inhibitora.



Rycina 3.12 Schemat przedstawiający reakcję rozszczepienia łańcucha plazmidowego DNA przez gyrazę DNA *M. tuberculosis* w obecności inhibitora - moksyflokscyny. Opracowano z wykorzystaniem programu BioRender

### 3.8.4 Test oceny tworzenia kompleksów gyrazy DNA

W celu oceny wiązania podjednostek GyrA oraz GyrB przeprowadzono test tworzenia kompleksów (pull-down). W pierwszym etapie zmieszano 100  $\mu\text{g}$  GyrA po odcięciu metki histydynowej za pomocą proteazy TEV oraz 50  $\mu\text{g}$  GyrB z metką

i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie 80  $\mu$ l złoża agarozowego wysyconego jonami niklu przepłukiwano buforem w celu kalibracji (50mM bufor cytrynianowy, 250 mM NaCl) i наносzono 200  $\mu$ l mieszaniny białek. Inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano (1000 x g, 1 minuta, 4C) i zbierano supernatant – frakcję niezwiązanego białka. Następnie płukano buforem (50 mM bufor cytrynianowy, 250 mM NaCl, 20 mM imidazol) trzykrotnie w celu wymycia niezwiązanych białek, a związane frakcje białka eluowano przez naniesienie 100  $\mu$ l buforu do elucji (50 mM bufor cytrynianowy, 250 mM NaCl, 500 mM imidazol), inkubację 5 minut w temperaturze pokojowej i wirowanie (1000 x g, 1 minuta, 4C). Zbierano supernatant, w którym znajdowały się białka związane ze złożem. Otrzymane frakcje analizowano przez zmieszanie 5  $\mu$ l próbki z buforem Laemmliego, denaturację przez gotowanie i analizę SDS-PAGE.

### 3.8.5 Test hydrolizy ATP

W celu oceny zdolności do hydrolizy ATP przeprowadzono sprzężony test oparty na ATP i NADH (ang. ATP/NADH coupled assay). W przypadku oceny aktywności podjednostki B gyrazy DNA wykorzystywano test ATPazowy niezależny od DNA. W 96-dółkowej, płaskodennej, transparentnej płytce przygotowywano mieszaniny reakcyjne składające się z:

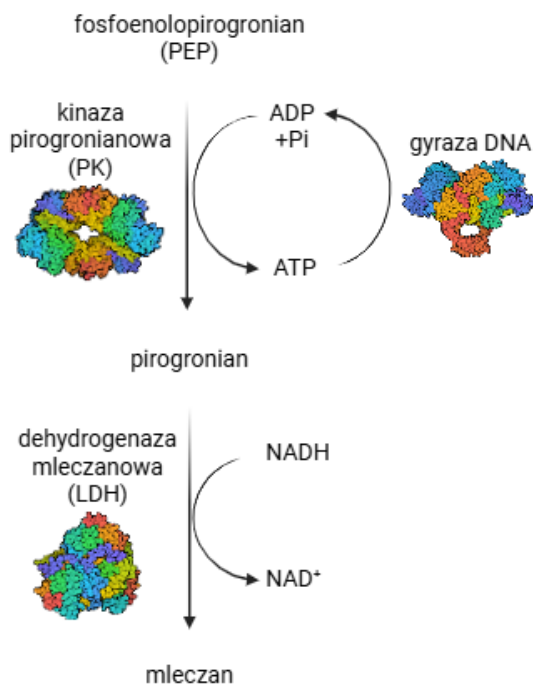
- 75  $\mu$ l buforu reakcyjnego (końcowe stężenia: 50 mM HEPES, 8 mM octan magnezu, 5 mM 2-merkaptioetanol, 150 mM octan potasu, 2 mM fosfoenolopirogronian (PEP), 0,16 mM NADH, 1% mieszaniny kinaza pirogronianowa/dehydrogenaza mleczanowa (PK/LDH)),
- 10  $\mu$ l białka GyrB o stężeniu 8  $\mu$ M (lub buforu w którym znajdowało się białko),
- 10  $\mu$ l nowobiocyny o stężeniu 100  $\mu$ M (jako kontroli zahamowania aktywności gyrazy) lub wody.

Płytkę umieszczano w spektrofotometrze CLARIOstar (BMG LABTECH) w celu wstępnego pomiaru absorbancji przez 10 minut w temperaturze 30°C. Następnie w celu rozpoczęcia reakcji dodawano 5  $\mu$ l ATP o stężeniu 100 mM i mierzono absorbancję przy długości fali 340 nm. Pomiarów dokonywano przez 60 minut co minutę w temperaturze 30°C z mieszaniem 300 rpm przez 5 sekund przed każdym pomiarem.

W przypadku oceny hydrolizy ATP przez kompleks gyrazy DNA przeprowadzono test ATPazowy zależny od DNA (Ryc. 3.13). W 96-dołkowej płytce przygotowywano mieszaniny reakcyjne składające się z:

- 75  $\mu\text{l}$  buforu reakcyjnego zawierającego dodatkowo 3  $\mu\text{g}$  plazmidu pBR322 w formie liniowej,
  - 10  $\mu\text{l}$  gyrazy DNA o stężeniu 2  $\mu\text{M}$  lub buforu w którym znajdowało się białko,
  - 10  $\mu\text{l}$  nowobiocyny o stężeniu 100  $\mu\text{M}$  lub wody.
- Dalszych pomiarów i rozpoczęcia reakcji poprzez dodanie ATP dokonywano w analogiczny sposób jak dla testu niezależnego od DNA.

Dane analizowano z wykorzystaniem prawa Lamberta-Beera  $\Delta A = \epsilon \cdot L \cdot C$ , gdzie  $\Delta A$  to zmiana wartości absorbancji, czyli różnica pomiędzy absorbancją w obecności gyrazy i bez białka,  $\epsilon$  - molowy współczynnik ekstynkcji, który dla NADH wynosi 6,22  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $L$  - długość ścieżki optycznej dla reakcji o objętości 100  $\mu\text{l}$ , która wynosiła 0,34 cm,  $C$  - stężenie molowe NADH podane w molach/L [M]. Po przekształceniu  $C = \Delta A / (\epsilon \cdot L)$  obliczano stężenie NADH. Założono, że 1 mol NADH odpowiada 1 molowi ATP, a zatem hydroliza 1 mola ATP odpowiada utlenieniu 1 mola NADH co widoczne jest w spadku wartości absorbancji.



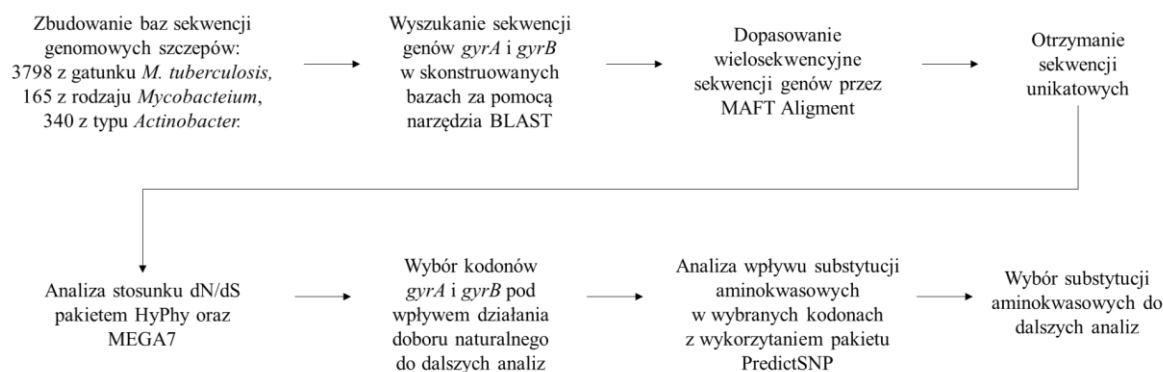
Rycina 3.13 Schemat przedstawiający zasadę działania testu oceniającego hydrolizę ATP. Schemat opracowano z wykorzystaniem programu BioRender.

Dodatkowo oceniono poziom aktywności białek pomiędzy 45-60 minutą testu, co zostało wyznaczone na podstawie równania: aktywność ATPazowa ( $S^{-1}$ ) =  $\Delta A / (\epsilon \times L \times T \times CE)$ , gdzie  $1/S$  – wskaźnik aktywności na sekundę,  $\Delta A$  – zmiana absorbancji przy długości fali 340 nm,  $\epsilon$  - molowy współczynnik ekstynkcji NADH, L – długość ścieżki optycznej dla reakcji o objętości 100  $\mu$ l, CE – stężenie molowe enzymu podane w molach/L [M].

## 4. Wyniki

### 4.1 Identyfikacja kodonów mykobakteryjnej gyrazy DNA pod wpływem działania doboru naturalnego

W celu identyfikacji kodonów gyrazy DNA *M. tuberculosis* będących pod wpływem doboru naturalnego wykorzystano szereg narzędzi bioinformatycznych, które zaprezentowano na Rycinie 4.1. W poprzednich badaniach, w trakcie trwania pracy magisterskiej, na podstawie przeprowadzonych analiz *in silico* wybrano pięć kodonów genów *gyrA* oraz *gyrB* będących pod wpływem działania doboru różnicującego, w których substytucje potencjalnie mogą być związane z tworzeniem lekooporności. Wybrano również 32 kodony pod wpływem działania doboru oczyszczającego, które potencjalnie mogą być miejscami konserwatywnymi i stanowić dobre miejsce wiązania dla nowych leków (Tab. 4.1), przy czym pozycja 565 została włączona do badań choć prawdopodobieństwo działania doboru różnicującego zostało wyznaczone tuż poniżej linii odcięcia (prawdopodobieństwo a’posteriori  $dN>dS$  FUBAR 0,94, przy przyjętym odcięciu 0,95) W następnym etapie ustalono konkretne substytucje aminokwasowe w wybranych kodonach, które zostały przetestowane w dalszych analizach. Dla kodonów będących pod działaniem doboru różnicującego wybrano substytucje obserwowane w populacji *M. tuberculosis*, mogące mieć związek z pojawianiem się szczepów lekoopornych. Z kolei dla kodonów będących pod działaniem doboru oczyszczającego, określono substytucje z wykorzystaniem analiz *in silico* PredictSNP. Wytypowano po dwie substytucje na daną pozycję, tak aby zmiana aminokwasu miała neutralny lub jak najmniej szkodliwy wpływ na funkcjonowanie białka. Dla białka GyrA wybrano trzy substytucje aminokwasowe potencjalnie związane z tworzeniem lekooporności oraz 12 substytucji w kodonach będących pod działaniem doboru oczyszczającego. Dla białka GyrB wybrano sześć substytucji mogących mieć związek z tworzeniem lekooporności oraz 52 w kodonach mogących stanowić miejsce konserwatywne (Tab. 4.2, Tab. 4.3).



Rycina 4.1 Schemat przeprowadzonych analiz bioinformatycznych w celu poszukiwania kodonów *gyrA/gyrB* *M. tuberculosis* pod wpływem działania doboru naturalnego

Tabela 4.1 Kodony pod wpływem działania doboru różnicującego i oczyszczającego wybrane do dalszych badań na podstawie analiz *in silico*.

gen	Kodon pod doborem różnicującym w bazie <i>M. tuberculosis</i>	Kodon pod działaniem doboru oczyszczającego
<i>gyrA</i>	90, 94	131, 162, 196, 368, 447, 482
<i>gyrB</i>	446, 447, 565	22, 24, 41, 48, 60, 114, 118, 122, 143, 168, 176, 193, 210, 256, 318, 341, 347, 352, 353, 374, 420, 524, 582, 594, 620, 646

Tabela 4.2 Wybrane substytucje aminokwasowe w białku GyrA wyznaczone do dalszych badań.

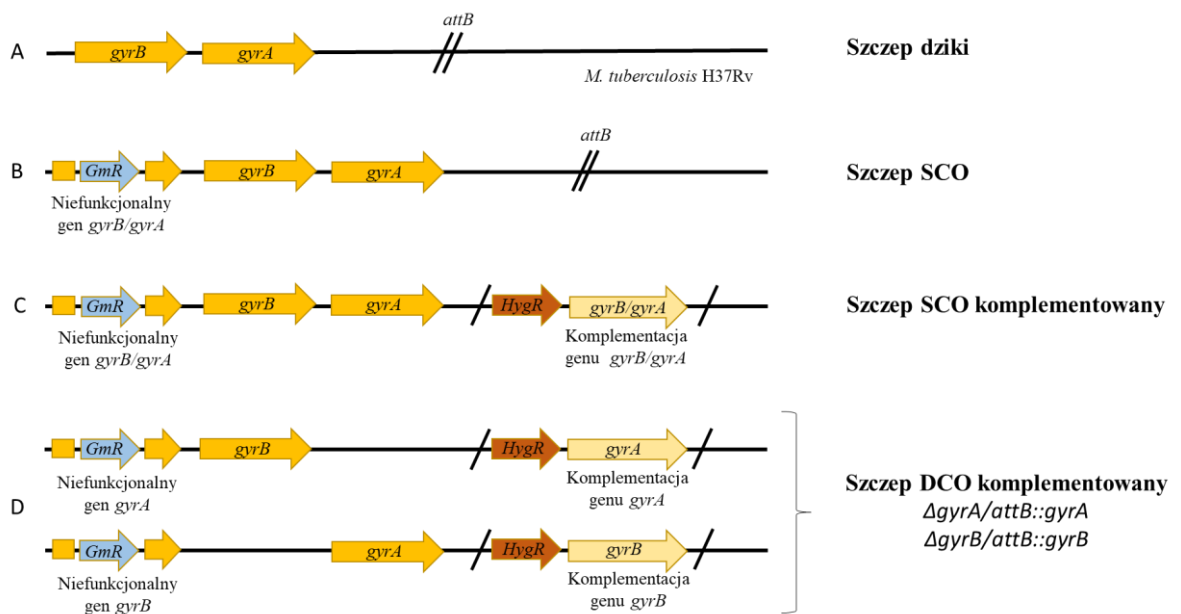
Substytucje w kodonach GyrA będących pod doborem różnicującym	Substytucje w kodonach GyrA będących pod doborem oczyszczającym	
D94C	E131A	E131L
D94G	E162Q	E162V
A90V	E196D	E196Q
	E447Q	E447A
	E482D	E482Q
	H368F	H368Y

Tabela 4.3 Wybrane substytucje aminokwasowe w białku GyrB wyznaczone do dalszych badań.

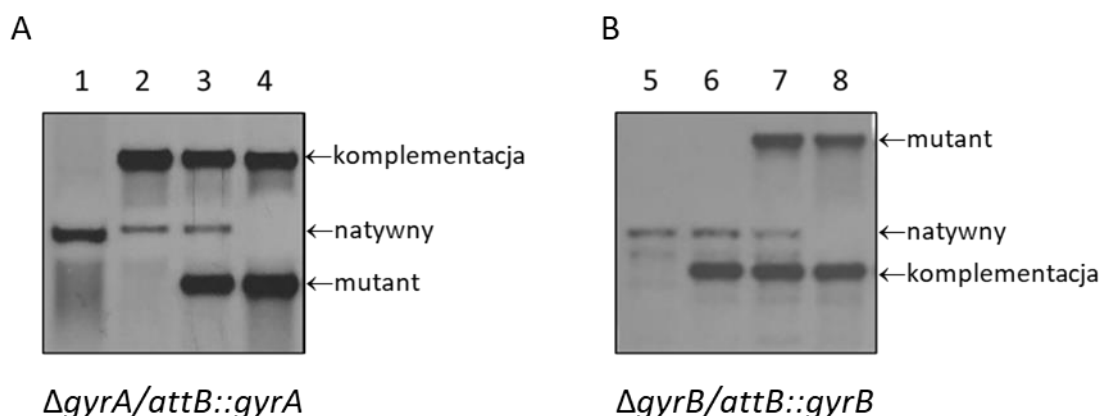
Substytucje w kodonach GyrB będących pod doborem różnicującym	Substytucje w kodonach GyrB będących pod doborem oczyszczającym	
Q565H	A420S	A420G
R446C	D176S	D176A
R446H	D210E	D210N
R446L	D584E	D584G
S447F	E24D	E24Q
S447Y	E318D	E318Q
	E352D	E352Q
	E48D	E48Q
	E620Q	E620D
	E646Q	E646D
	G118A	G118S
	G122A	G122S
	G143N	G143S
	G168A	G168S
	G22A	G22S
	G256A	G256S
	G347N	G347T
	G353A	G353S
	G41A	G41S
	G594A	G594T
	G60A	G60S
	K341R	K341Q
	K374R	K374Q
	R193K	R193Q
	Y114F	Y114W
	Y524F	Y524W

## 4.2 Konstrukcja modeli genetycznych *M. tuberculosis* pozbawionych natywnych genów *gyrA* lub *gyrB*

W celu oceny wpływu wybranych w analizach bioinformatycznych mutacji w gyrazie DNA na funkcjonowanie komórek *M. tuberculosis*, skonstruowano szczepy knock-out z komplementacją genów *gyrA* i *gyrB* w miejscu *attB* ( $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ;  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ ) jak opisano w rozdziale Materiały i metody 3.5.9 (Ryc. 4.2). Uzyskane rekombinowane szczepy umożliwiły relatywnie szybkie otrzymanie szczepów z badanymi mutacjami punktowymi w genach *gyrA* i *gyrB*. Szczepy uzyskano poprzez wymianę, na drodze miejscowo-specyficznej rekombinacji, komplementacji „dzikim” genem *gyrA* lub *gyrB* na geny noszące badane mutacje co umożliwiło określenie znaczenia wybranych mutacji w szczepach *M. tuberculosis* o jednolitym tle genetycznym. Poprawność genotypów skonstruowanych mutantów weryfikowano przez amplifikację odpowiednich fragmentów DNA chromosomalnego z wykorzystaniem sekwencji starterowych (Metody 3.4.1, Tab. 3.3), hybrydyzację Southern blot z sondą genetyczną (Ryc. 4.3) (Metody 3.5.10) oraz poprzez sekwencjonowanie nanoporowe urządzeniem MinION (Oxford Nanopore Technologies).

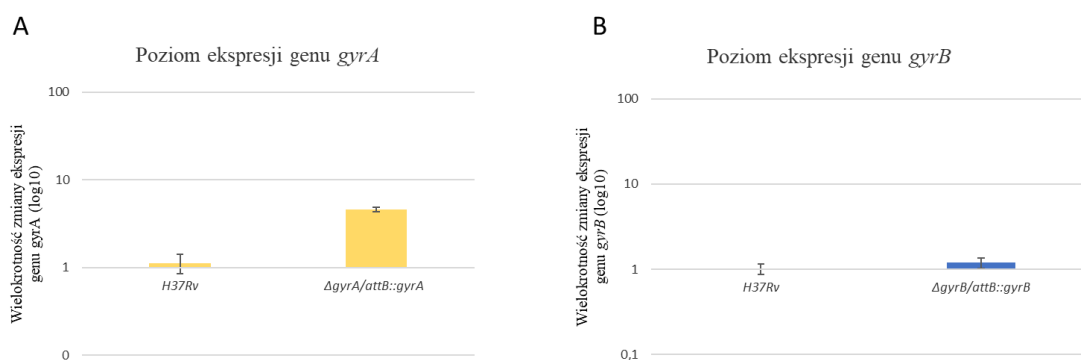


Rycina 4.2 Schemat przedstawiający konstrukcję modeli genetycznych *M. tuberculosis* pozbawionych natywnych genów *gyrA* lub *gyrB* i z komplementacją odpowiedniego genu w miejscu *attB*. Schemat genomu A) *M. tuberculosis*, B) szczepu SCO (ang. single cross-over), C) szczepu SCO z komplementacją, D) szczepu DCO (ang. double cross-over) z komplementacją.



Rycina 4.3 Potwierdzenie genotypu skonstruowanych modeli genetycznych z wykorzystaniem techniki Southern blot. A) Konstrukcja mutantu  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  z komplementacją genu  $gyrA_{P_{metE}MVHyg}$ . Chromosomalny DNA szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* H37Rv - 1; mutantu SCO - 2; SCO z komplementacją  $gyrA_{P_{metE}MVHyg}$  - 3; DCO z komplementacją  $gyrA_{P_{metE}MVHyg}$  - 4, trawiono endonukleazą PvuII. B) Konstrukcja mutantu  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  z komplementacją genu  $gyrB_{P_{nat}MVHyg}$ . Chromosomalny DNA szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* H37Rv - 5; mutantu SCO - 6; SCO z komplementacją  $gyrB_{P_{nat}MVHyg}$  - 7; DCO z komplementacją  $gyrB_{P_{nat}MVHyg}$  - 8, trawiono enzymami PvuII i HindIII, Na rycinie strzałkami zaznaczono fragmenty DNA wskazujące na obecność genu natywnego, genu komplementowanego w miejscu *attB* oraz mutantu (genu z delecją).

Ze względu na komplementację genu *gyrA* pod promotorem *metE* przeprowadzono weryfikację poziomu ekspresji genów kodujących podjednostki gyrazy DNA z wykorzystaniem techniki qPCR. W pierwszym etapie izolowano RNA ze szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* H37Rv oraz otrzymanych modeli genetycznych, hodowanych na podłożu bogatym 7H9/OADC/Tween80, do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu. Następnie otrzymane próbki poddawano trawieniu DNAzą i reakcji odwrotnej transkrypcji w celu syntezy cDNA, który posłużył do przeprowadzenia ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. Jako gen referencyjny wykorzystano *sigA*, ulegający konstytutywnej ekspresji w komórkach *Mycobacterium* w różnych warunkach hodowli. Analiza metodą komparatywną wykazała 4-krotny wzrost ekspresji genu *gyrA* w szczepie  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  w stosunku do *M. tuberculosis* H37Rv. Poziom ekspresji genu *gyrB* w skonstruowanym modelu nie uległ zmianie (Ryc. 4.4).



Rycina 4.4 Analiza poziomu ekspresji genów A) *gyrA* oraz B) *gyrB* w skonstruowanych modelach genetycznych: odpowiednio  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  w stosunku do szczepu referencyjnego *M. tuberculosis* H37Rv.

W celu oceny możliwości wykorzystania skonstruowanych szczepów do analiz poziomu wrażliwości na leki, ustalono minimalne stężenia hamujące wzrost bakterii dla pięciu fluorochinolonów. Wartości MIC fluorochinolonów: 2 generacji – ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), 3 generacji: lewofloksacyny (LFX) oraz 4 generacji: moksyfloksacyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX), dla skonstruowanych modeli genetycznych, były takie same jak dla szczepu referencyjnego *M. tuberculosis* H37Rv (Tab. 4.4)

Tabela 4.4 Ocena wartości MIC fluorochinolonów: ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), lewofloksacyny (LFX), moksyfloksacyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX) przeprowadzona metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i odczynnika Alamar blue dla wybranych szczepów *M. tuberculosis*.

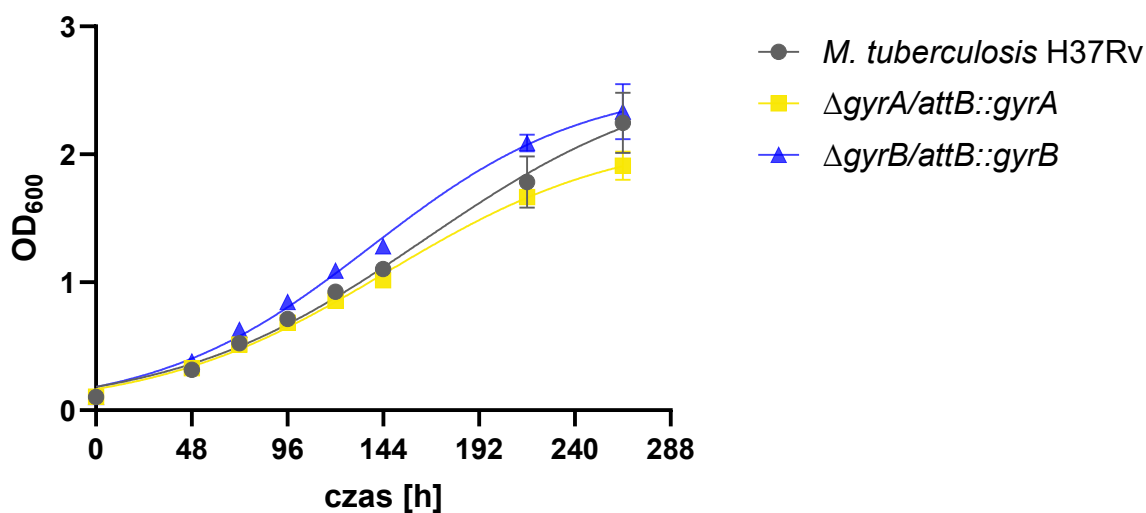
szczep	MFX [µg/ml]	OFX [µg/ml]	CIP [µg/ml]	GFX [µg/ml]	LFX [µg/ml]
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25

Dodatkowo oceniono stężenie moksyfloksacyny wykazujące efekt bakteriobójczy (MBC), czyli zdolność do zabicia >99% bakterii. Wartość MBC dla moksyfloksacyny wynosiła 0,1 µg/ml zarówno dla skonstruowanych szczepów jak i szczepu kontrolnego H37Rv (Tab. 4.5).

Tabela 4.5 Ocena wartości MBC moksyflokscyny dla wybranych szczepów *M. tuberculosis*.

szczep	MBC dla MFX [μg/ml] w 7 dniu	Średni % liczby komórek przy wartości MBC	MBC dla MFX [μg/ml] w 14 dniu	Średni % liczby komórek przy wartości MBC
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,1	0,24% ± 0,34%	0,1	0,83% ± 0,14%
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,1	0,3% ± 0,33%	0,1	0,4% ± 0,5%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,1	0,08% ± 0,08%	0,1	0,18% ± 0,09%

W kolejnym etapie badań analizowano kinetykę wzrostu badanych szczepów na podłożu bogatym (7H9/OADC/Tween80) poprzez pomiar gęstości optycznej OD<sub>600</sub>. Wykazano brak istotnych statystycznie różnic w tempie wzrostu skonstruowanych modeli genetycznych w stosunku do szczepu *M. tuberculosis* H37Rv (Ryc. 4.5).



Rycina 4.5 Kinetyka wzrostu szczepów *M. tuberculosis* H37Rv (szary),  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  (żółty) oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  (niebieski) w warunkach standardowych. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla prób niesparowanych przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$  w programie GraphPad.

Przeprowadzone badania na skonstruowanych modelach genetycznych  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  i  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  wykazały brak różnic w ocenie wartości MIC, MBC i tempa wzrostu oraz niewielki wzrost ekspresji genu *gyrA*. Ze względu na brak różnic w oporności na fluorochinolony oraz konieczność równomolowej obecności podjednostek GyrA i GyrB dla aktywności gyrazy DNA, zdecydowano o kontynuowaniu dalszych badań na skonstruowanych modelach genetycznych  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ .

#### 4.3 Ocena wpływu mutacji punktowych w kodonach gyrazy będących pod dobozem różnicującym na lekooporność *M. tuberculosis*

##### 4.3.1 Uzyskanie mutantów *M. tuberculosis* noszących mutacje w *gyrA* i *gyrB*.

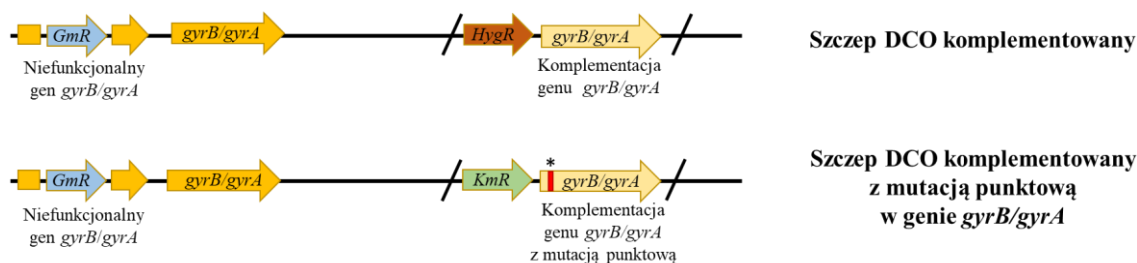
Zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Materiały i metody (3.5.9) przygotowano rekombinowane plazmidy pMV306-KmR zawierające geny *gyrA* lub *gyrB* z wprowadzonymi z zastosowaniem mutagenyzy punktowej (Metody 3.5.11) mutacjami punktowymi (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Wprowadzone mutacje punktowe w kodonach genów *gyrA/gyrB* w celu uzyskania szczepów potencjalnie lekoopornych względem fluorochinolonów.

gen	substytucja	kodon natywny	kodon z mutacją
<i>gyrB</i>	R446C	CGT	TGT
<i>gyrB</i>	R446H	CGT	CAT
<i>gyrB</i>	R446L	CGT	CTT
<i>gyrB</i>	S447F	TCC	TTC
<i>gyrB</i>	S447Y	TCC	TAC
<i>gyrB</i>	E501D	GAA	GAC
<i>gyrB</i>	Q565H	CAA	CAC
<i>gyrA</i>	A90V	GCG	GTG
<i>gyrA</i>	D94C	GAC	TGC
<i>gyrA</i>	D94G	GAC	GGC

Plazmidy te wykorzystano następnie do wymiany, na drodze miejscowo-specyficznej rekombinacji, komplementacji genów w szczepach modelowych

*M. tuberculosis*  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  zastępując „dzikie” formy genów *gyrA* lub *gyrB* genami zawierającymi badane mutacje (Rycina 4.6).



Rycina 4.6 Schemat przedstawiający wprowadzanie mutacji punktowych w genach *gyrA/gyrB* szczepów *M. tuberculosis* DCO z komplementacją ( $\Delta gyrA/attB::gyrA$  lub  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ ).

Obecność wprowadzonych mutacji punktowych w uzyskanych szczepach *M. tuberculosis* ( $\Delta gyrA/attB::gyrA_{mut}$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB_{mut}$ ) sprawdzano przez amplifikację fragmentu genu *gyrA* lub *gyrB* zawierającego analizowane mutacje punktowe z wykorzystaniem odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych (Metody 3.4.1, Tab. 3.8), które poddawano sekwencjonowaniu metodą Sanger. Uzyskano dziewięć rekombinowanych szczepów z mutacjami w kodonach będących pod dobozem różnicującym, wybranych na podstawie analiz bioinformatycznych: 90 i 94 dla *gyrA* oraz 446, 447 i 565 dla *gyrB* (Tab. 4.6). Dodatkowo jako kontrolę pozytywną przygotowano szczep z mutacją w kodonie 501 *gyrB*, która warunkuje oporność na moksyflokscynę.

#### 4.3.2 Ustalenie poziomu wrażliwości na fluorochinolony

W celu zbadania zależności pomiędzy obecnością mutacji w kodonach pod dobozem różnicującym, a zwiększonym poziomem oporności na fluorochinolony oceniono wrażliwość rekombinowanych szczepów *M. tuberculosis* zawierających badane mutacje na pięć fluorochinolonów. Ocenę przeprowadzono metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym 7H9/OADC/Tween80 z użyciem odczynnika Alamar Blue (Metody 3.3.5), (Tab. 4.7). Dodatkowo ocenę wartości MIC dla badanych fluorochinolonów przeprowadzono podczas odbywania stażu w laboratorium referencyjnym w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i analizy obecności osadu komórkowego (Tab. 4.8).

Tabela 4.7 Ocena wartości MIC fluorochinolonów: ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), lewofloksacyny (LFX), moksyflokscyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX) metodą mikrorozcieńczeń i odczynnika Alamar blue dla wybranych szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi.

szczep	MFX [µg/ml]	OFX [µg/ml]	CIP [µg/ml]	GFX [µg/ml]	LFX [µg/ml]
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ A90V	0,5	4	2	0,5	2
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94G	1	8	4	0,5	4
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94C	0,5	4	2	0,25	2
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446C	0,125	1	0,5	0,25	1
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446H	0,25	1	0,5	0,125	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446L	0,125	0,5	0,5	0,125	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447F	0,125	1	0,5	0,125	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447Y	0,125	1	0,5	0,125	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E501D	1	0,5	0,5	0,5	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ Q565H	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25

Tabela 4.8 Ocena wartości MIC fluorochinolonów: ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), lewofloksacyny (LFX), moksyflokscyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX) metodą mikrorozcieńczeń i oceny obecności osadu komórkowego dla wybranych szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi. Badanie przeprowadzono w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prętka w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

szczep	MFX [µg/ml]	OFX [µg/ml]	CIP [µg/ml]	GFX [µg/ml]	LFX [µg/ml]
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,125	1	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,125	1	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ A90V	2	8	8	1	4
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94G	2	8	8	1	4
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94C	0,5	4	8	0,5	2
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446C	0,5	2	1	0,5	1
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446H	0,5	2	0,5	0,25	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446L	0,5	2	1	0,5	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447F	0,5	2	1	0,25	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447Y	0,5	2	0,5	0,25	0,5
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E501D	2	1	0,5	1	0,5

Szczepy *M. tuberculosis* z mutacjami A90V, D94G w *gyrA* oraz E501D, S447F w *gyrB*, na podstawie danych przedstawianych przez Światową Organizację Zdrowia, są obecnie uznane jako związane z pojawianiem się oporności na fluorochinolony i stanowiły kontrolę pozytywną przeprowadzanych badań. Zidentyfikowano pięć nowych mutacji: D94C w *gyrA* oraz R446C, R446H, R446L i S447Y w *gyrB*, które warunkują wzrost poziomu oporności na szereg fluorochinolonów w stosunku do szczepów kontrolnych  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ . W przypadku mutacji R446L w GyrB w metodzie z wykorzystaniem odczynnika Alamar Blue obserwowano brak wzrostu oporności na ofloksacynę, podobnie jak dla szczepu kontrolnego z mutacją E501D. Dla szczepu z substytucją w kodonie 565 *gyrB* nie odnotowano zmian wartości MIC w stosunku do szczepu kontrolnego.

#### 4.3.3 Określenie efektu bójczego (MBC) moksyflokscyny na rekombinowane szczepy

Dla wykonania pełniejszej analizy wpływu nowych mutacji w *gyrA* oraz *gyrB* warunkujących wzrost lekooporności, zdecydowano o ocenie efektu bakteriobójczego moksyflokscyny potrzebnego do zabicia >99% bakterii (MBC) skonstruowanych szczepów. W tym celu prowadzono hodowlę wybranych szczepów *M. tuberculosis* w obecności szeregu stężeń moksyflokscyny i oceniano ich tempo wzrostu przez pomiar gęstości optycznej oraz określano procent przeżywalności przez ocenę liczby jednostek koloniotwórczych (CFU) po 7 i 14 dniach hodowli w obecności moksyflokscyny w stosunku do hodowli bez antybiotyku (Tab. 4.9).

Tabela 4.9 Ocena wartości MBC otrzymanych mutantów wykazujących wzrost oporności względem moksyflokscyny.

szczep	MBC [μg/ml] w 7 dniu	Średni % liczby komórek w 7 dniu	MBC [μg/ml] w 14 dniu	Średni % liczby komórek w 14 dniu
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,1	0,30%±0,33%	0,1	0,40%±0,5%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,1	0,08%±0,08%	0,1	0,18%±0,09%
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94C	0,7	0,38%±0,28%	0,7	0,11%±0,08%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446C	0,3	0,31%±0,13%	0,3	0,24%±0,06%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446H	0,3	0,57%±0,3%	0,3	0,53%±0,27%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446L	0,3	0,03%±0,02%	0,3	0,86%±0,06%

$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447F	0,3	0,62%±0,18%	0,3	0,14%±0,21%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447Y	0,3	0,51%±0,33%	0,3	0,19%±0,16%
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E501D	1,5	0,03%±0,02%	1,5	0,38%±0,35%

Wartości MBC dla moksyfloksacyny w 7 i 14 dniu wynosiły: dla mutacji D94C w *gyrA* 0,7 µg/ml, a dla R446C, R446H, R446L, S447Y w *gyrB* 0,3 µg/ml. Mutacje S447F oraz E501D w *gyrB* z wartościami MBC odpowiednio 0,3 µg/ml i 1,5 µg/ml stanowiły kontrolę pozytywną. Potwierdzono związek obecności nowych mutacji ze wzrostem oporności na moksyfloksacynę. Dodatkowo zaobserwowano, że stosunek wartości MBC/MIC jest mniejszy niż 4, co potwierdza efekt bakteriobójczy moksyfloksacyny również względem szczepów z wybranymi mutacjami.

#### 4.3.4 Ustalenie poziomu oporności szczepów z mutacjami w kodonach pod doborem różnicującym na związek z grupy NBTI

W kolejnym etapie pracy zdecydowano o badaniu wpływu wybranych mutacji na wrażliwość względem związku z innej grupy inhibitorów gyrazy DNA – NBTI (ang. novel bactericidal topoisomerase inhibitors). Do testów wybrano gepotidacynę, antybiotyk z klasy triazaacenaftylenów. Ocenę wrażliwości szczepów  $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  oraz z mutacjami R446C, R446H, R446L, S447Y, S447F, E501D w *gyrB* i A90V, D94C, D94G w *gyrA* przeprowadzono metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i wskaźnika Alamar Blue (Tab. 4.10).

Tabela 4.10 Ocena wrażliwości wybranych szczepów *M. tuberculosis* na gepotidacynę z wykorzystaniem metody mikrorozcieńczeń i wskaźnika Alamar Blue.

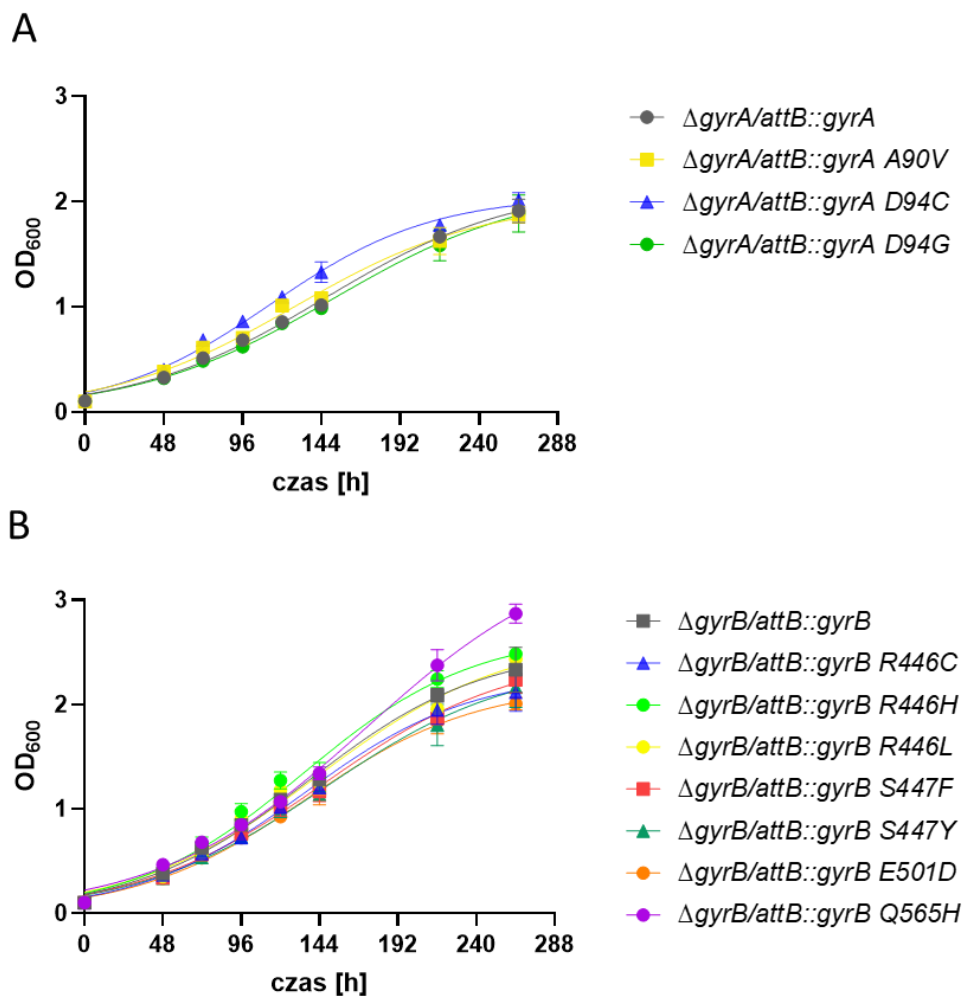
szczep	MIC [µg/ml]	MIC [µM]
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1,56	3,47
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	1,56	3,47
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	1,56	3,47
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ A90V	0,78	1,74
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94C	3,13	6,98

$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94G	1,56	3,47
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446C	3,13	6,98
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446H	3,13	6,98
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ R446L	3,13	6,98
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447F	6,25	13,93
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ S447Y	6,25	13,93
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E501D	3,13	6,98
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ Q565H	1,56-3,13	3,47-6,98

W przypadku szczepów z substytucjami D94C w *gyrA* oraz R446C, R446H, R446L, E501D w *gyrB* zaobserwowano zwiększoną oporność na gepotidacynę. Dla szczepów z mutacjami w kodonie 447 *gyrB* wykryto znaczny wzrost oporności, a wartości MIC były czterokrotnie wyższe w stosunku do szczepów kontrolnych, bez mutacji. Mutacja D94G w *gyrA* nie powodowała zmian wartości MIC, a w przypadku wariantu A90V obserwowano zwiększoną wrażliwość na antybiotyk z grupy NBTI. Dla wariantu z mutacją w kodonie 565 *gyrB* pomimo kilkunastu prób, obserwowano różnice w otrzymywanych wartościach i ustalono MIC w zakresie 1,56-3,13  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.3.5 Określenie tempa wzrostu rekombinowanych szczepów *M. tuberculosis*

Analizę kinetyki wzrostu przeprowadzono w celu weryfikacji czy działanie doboru różnicującego może mieć wpływ na tempo wzrostu szczepów *M. tuberculosis* noszących wybrane mutacje. Dodatkowo oceniono czy kinetyka wzrostu może wpływać na poziom wrażliwości na fluorochinolony (wartości MIC). W tym celu badane szczepy *M. tuberculosis* hodowano na podłożu bogatym i oceniano gęstość optyczną hodowli OD<sub>600</sub> w siedmiu, wybranych punktach czasowych: 48, 72, 96, 120, 144, 216 i 264 godzin (Ryc. 4.7).



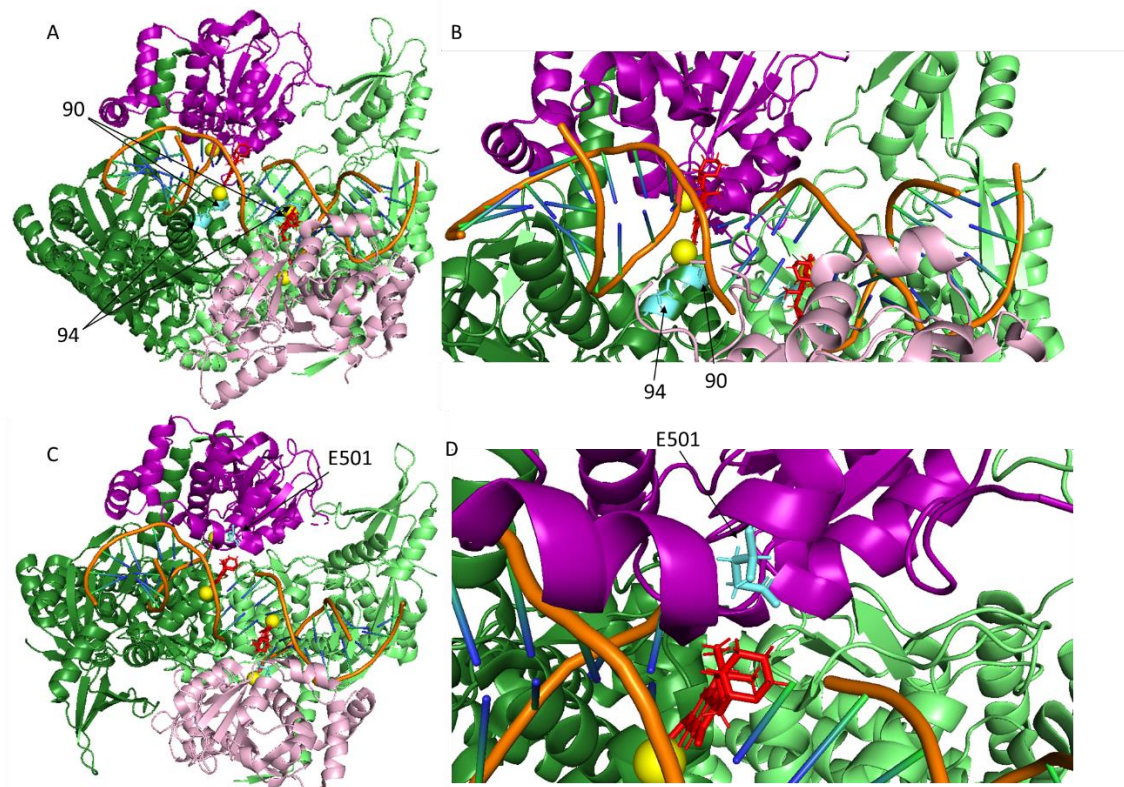
Rycina 4.7 Analiza tempa wzrostu szczepów z mutacjami w genach A) *gyrA* oraz B) *gyrB* wybranych w analizach *in silico* jako miejsca pod doбором różnicującym. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla prób niesparowanych przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$  w programie GraphPad.

Analiza kinetyki wzrostu nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy szczepami *M. tuberculosis* z badanymi mutacjami: A90V, D94G, D94C w *gyrA* oraz R446C, R446H, R446L, S447F, S447Y, E501D, Q565H w *gyrB* w porównaniu do szczepów kontrolnych bez mutacji. W przypadku szczepu z mutacją Q565H w *gyrB* obserwowano nieznacznie wyższe tempo wzrostu w ostatnim punkcie pomiarowym i późniejsze przejście w fazę stacjonarnego wzrostu.

### 4.3.6 Ocena wpływu substytucji aminokwasowych na aktywność rekombinowanych białek GyrA i GyrB

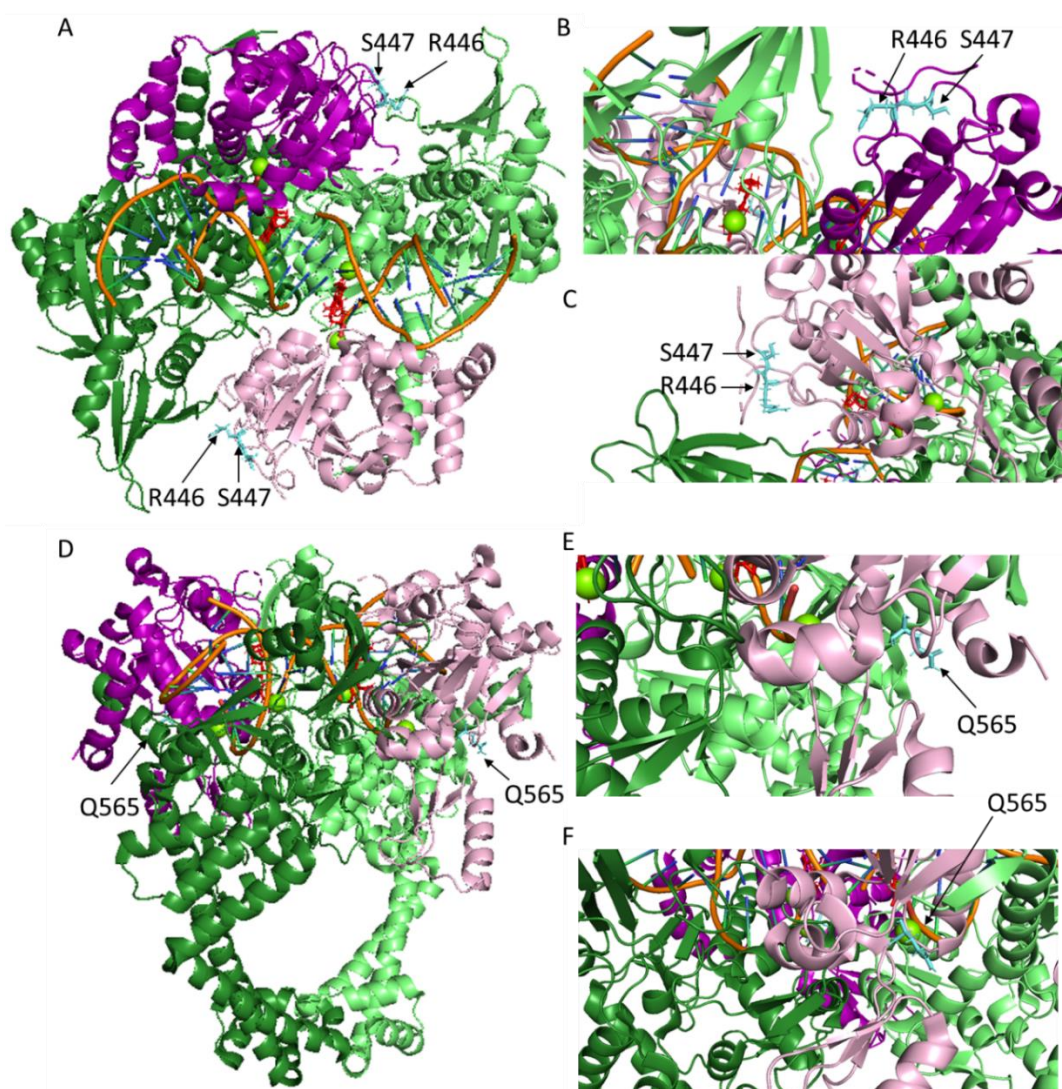
#### 4.3.6.1 Umieszczenie kodonów potencjalnie związanych z występowaniem lekooporności w gyrazie DNA *M. tuberculosis*

Kodony 90 i 94 GyrA umiejscowione w domenie N-końcowej cięcia i łączenia DNA (BRD) (Wstęp 1.3.2, Ryc. 1.7) i kodon 501 GyrB znajdujący się w domenie C-końcowej TOPRIM, odpowiedzialnej za interakcję z GyrA oraz wiązanie G-segmentu DNA<sup>45,86,103</sup> stanowiły kontrolę oporności na fluorochinolony. Miejsca te znajdują się w obrębie regionu związanego z występowaniem oporności na chinolony, QRDR w kieszeni wiążącej fluorochinolony (Ryc. 4.8).



Rycina 4.8 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 24 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności moksyflokscyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty) z zaznaczonymi kodonami 90, 94 (A, B) oraz 501 (C, D) w obrębie regionu QRDR, w których mutacje prowadzą do pojawienia się oporności na fluorochinolony. Kryształ 5BTA (A, B, C, D) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

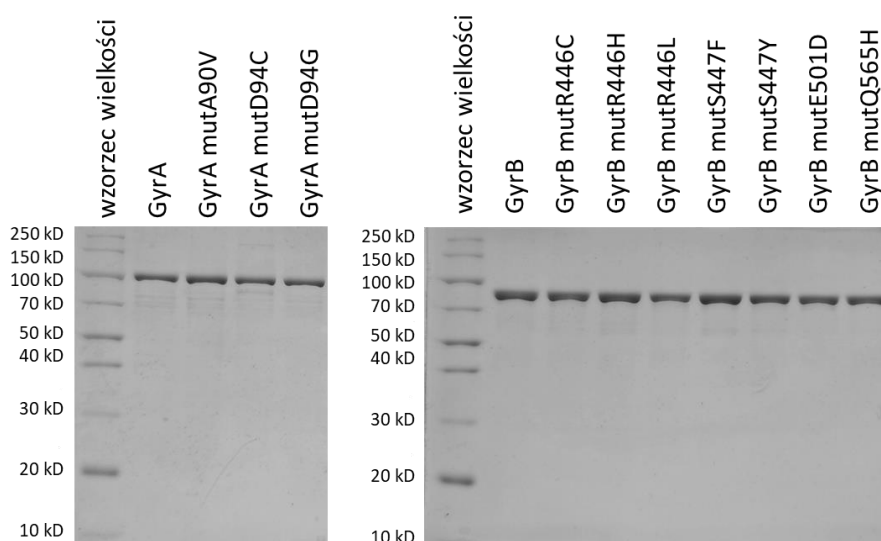
Kodony 446, 447 znajdują się w obrębie N-końcowej domenie ATPazowej, a dokładnie w subdomenie odpowiadającej za przekazywanie sygnału (transducer), na połączeniu z kolejną domeną GyrB: TOPRIM. Kodon 565 GyrB, podobnie jak kodon 501, znajdują się w domenie TOPRIM<sup>45,86,103</sup>. W zamkniętej konformacji kryształu 5BTA gyrazy DNA *M. tuberculosis*, kodony te wydają się być umiejscowione w zewnętrznych częściach białka (Ryc. 4.9).



Rycina 4.9 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 24 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności moksyflokscyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty) z zaznaczonymi kodonami 446 i 447 (A, B, C) oraz 565 (D, E, F) w GyrB, w których mutacje prowadzą do wzrostu poziomu oporności na fluorochinolony i gepotidacynę. Kryształ 5BTA (A-F) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

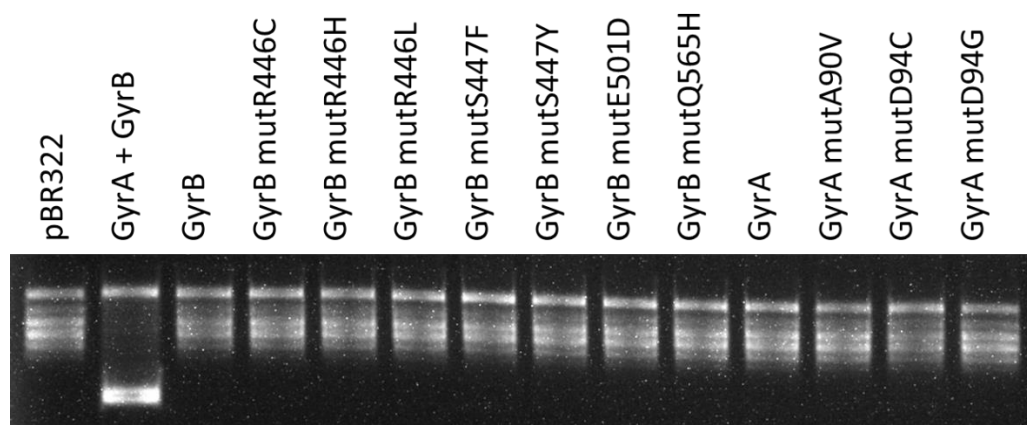
#### 4.3.6.2 Oczyszczanie rekombinowanych białek

W celu określenia wpływu substytucji aminokwasowych bezpośrednio na aktywność białek w testach *in vitro*, otrzymano białka rekombinowane GyrA oraz GyrB z wybranymi substytucjami. Wykorzystując system ekspresyjny *E. coli* oraz plazmidy ekspresyjne pHis.parallel1 z wklonowanymi genami *gyrA* lub *gyrB*, do których wprowadzono wybrane mutacje przez mutagenezę punktową (Tab. 4.6), dokonano nadprodukcji odpowiednich białek, które w kolejnym etapie oczyszczono wykorzystując chromatografię metalopowinowactwa (Metody 3.7.4), (Suplement Ryc. S1) oraz chromatografię żelową wykluczenia (Metody 3.7.5), (Ryc. 4.10).



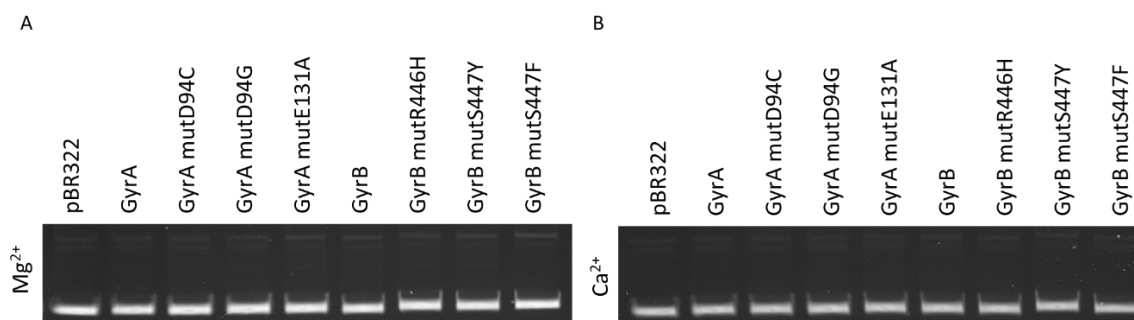
Rycina 4.10 Preparaty białkowe (2  $\mu$ g) GyrA oraz GyrB z substytucjami w kodonach pod doбором różnicującym (oczyszczone z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa oraz żelowej wykluczenia) po rozdziale w 12% żelu poliakrylamidowym.

Aby wykluczyć zanieczyszczenie nukleazami lub podjednostkami gyrazy pochodzącymi ze szczepu *E. coli* przeprowadzono test aktywności gyrazy (superskręcenia zrelaksowanego DNA plazmidowego w obecności 50  $\mu$ g/ml jednej podjednostki białka: około 540 nM GyrA oraz 670 nM GyrB), co pozwoliło na wykluczenie fałszywie pozytywnych wyników (Ryc. 4.11).



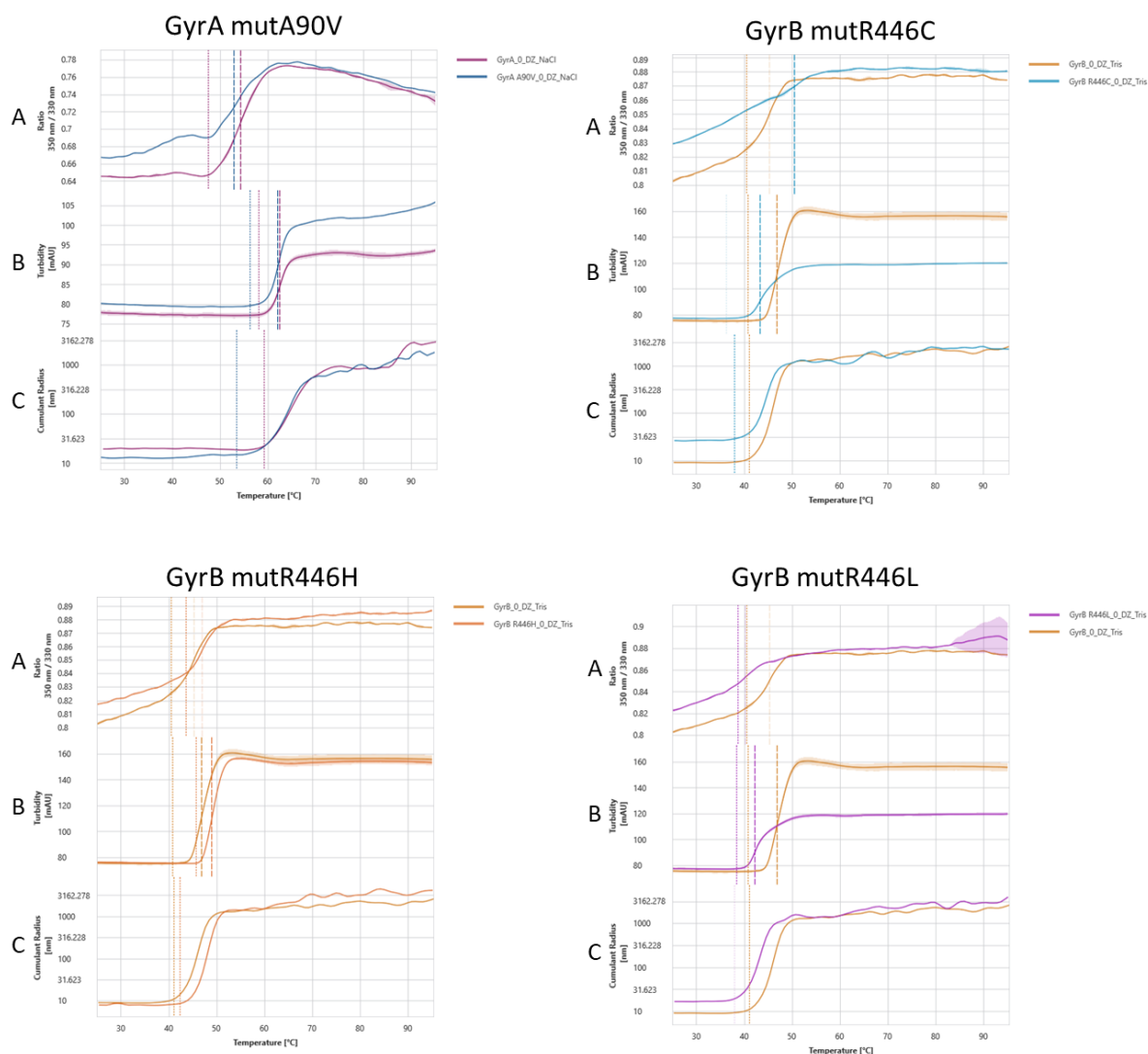
Rycina 4.11 Test zdolności do wprowadzania superskrętów w plazmidowym DNA (pBR322) w obecności 50  $\mu\text{g/ml}$  podjednostki GyrA lub GyrB z wybranymi substytucjami w celu oceny zanieczyszczeń białek.

Dodatkowo w celu oceny obecności śladowych zanieczyszczeń nukleazami, dla wybranych białek przeprowadzono test cięcia superskręconego, plazmidowego DNA (pBR322) w obecności jonów wapnia oraz magnezu (Ryc. 4.12). Do testu wykorzystano 30  $\mu\text{g/ml}$  białek (325 nM podjednostki GyrA i 400 nM GyrB). W przypadku testu z jonami wapnia nie zaobserwowano obecności liniowej formy DNA, natomiast w obecności jonów magnezu widoczna była niewielka aktywność nukleaz (forma liniowa nie przekroczyła 1% całkowitej ilości DNA plazmidowego). Ponadto test ten przeprowadzono dla dwukrotnie wyższego stężenia podjednostek GyrA oraz GyrB niż stężenie wykorzystane dalej do oceny zdolności kompleksów gyrazy do rozszczepiania łańcucha DNA.



Rycina 4.12 Test zdolności do wprowadzania cięć w superskręconym DNA plazmidu pBR322 przez GyrA lub GyrB z wybranymi substytucjami w obecności jonów: magnezu (A) i wapnia (B).

Ponadto w celu sprawdzenia prawidłowego sfałdowania otrzymanych białek z substytucjami w wybranych kodonach przeprowadzono analizę z wykorzystaniem systemu PrometheusPanta (NanoTemper). Analiza wykazała, że dla rekombinowanych białek GyrA temperatura topnienia wynosiła 50-60°C, a dla GyrB utrata struktury trzeciorzędowej następowała przy temperaturze 40-50°C (Ryc. 4.13 A).

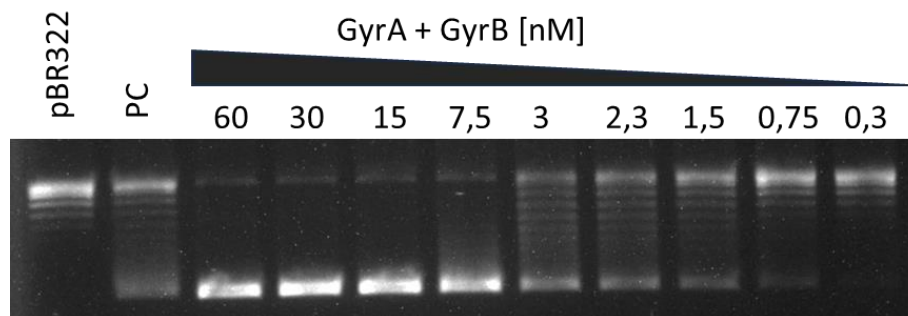


Rycina 4.13 Przykładowe krzywe denaturacji termicznej białek GyrA oraz GyrB z substytucjami w kodonach potencjalnie związanych ze wzrostem lekooporności na fluorochinolony w odniesieniu do białek kontrolnych. Panel A to wykres zależności stosunku absorbancji 350/330 nm (Ratio) od temperatury. Panel B wskazuje na zmętnienie próbki (Turbidity), a panel C średnicę hydrodynamiczną cząstek przez rozproszenie światła (Cumulant Radius) wraz ze wzrostem temperatury.

Wykresy zmętnienia (Turbidity) wskazują na powstawanie agregatów po denaturacji białka (Ryc. 4.13 B). Dla wariantów GyrB: mutR446C oraz mutR446L obserwowano szybszą agregację niż dla wariantu natywnego. Pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. dynamic light scattering) odzwierciedla wielkość i liczbę cząstek w roztworze wraz ze wzrostem temperatury przez analizę średnicy hydrodynamicznej (Cumulant Radius), co pozwala na określenie agregacji białek po ich denaturacji (Ryc. 4.13 C). Wykresy analizy z wykorzystaniem Prometheus Panta dla wszystkich białek GyrA oraz GyrB z substytucjami zostały zawarte w Suplemencie Ryc. S2. Przeprowadzone analizy wykazały, że badane białka zarówno typu dzikiego, jak i noszące mutacje posiadają prawidłową strukturę, a ewentualne różnice w ich aktywności będą wynikiem wprowadzonych substytucji, a nie denaturacji.

#### **4.3.6.3 Ocena zdolności do superskręcania DNA plazmidowego.**

Oczyszczone, rekombinowane białka z substytucjami posłużyły do przeprowadzenia testów *in vitro* pozwalających na ocenę wpływu danej substytucji na pojawianie się oporności na moksyflokscynę. Podstawową aktywnością gyrazy jest wprowadzanie negatywnych superskręć, co może być widoczne w różnicach pomiędzy formami topologicznymi plazmidowego DNA na obrazie żelu agarozowego po rozdzielaniu elektroforetycznym. W tym celu przeprowadzono test superskręcania plazmidowego DNA. W pierwszym etapie ustalono jedną jednostkę aktywności enzymu, czyli ilość potrzebną do pełnego skręcenia 0,5 µg zrelaksowanego DNA plazmidu pBR322 w czasie pół godziny (Ryc. 4.14, Suplement Ryc. S3). Dla białka natywnego jedną jednostkę aktywności ustalono przy 7,5 nM, a dla wariantów z substytucjami w GyrA: mutA90V – 7,5 nM, mutD94C – 12 nM, mutD94G – 9 nM oraz dla wariantów z substytucjami w GyrB: mutR446C – 15 nM, mutR446H – 7,5 nM, mutR446L – 120 nM, mutS447F – 15 nM, mutS447Y – 30 nM, mutE501D – 60 nM, mutQ565H – 7,5 nM (Tab. 4.11).

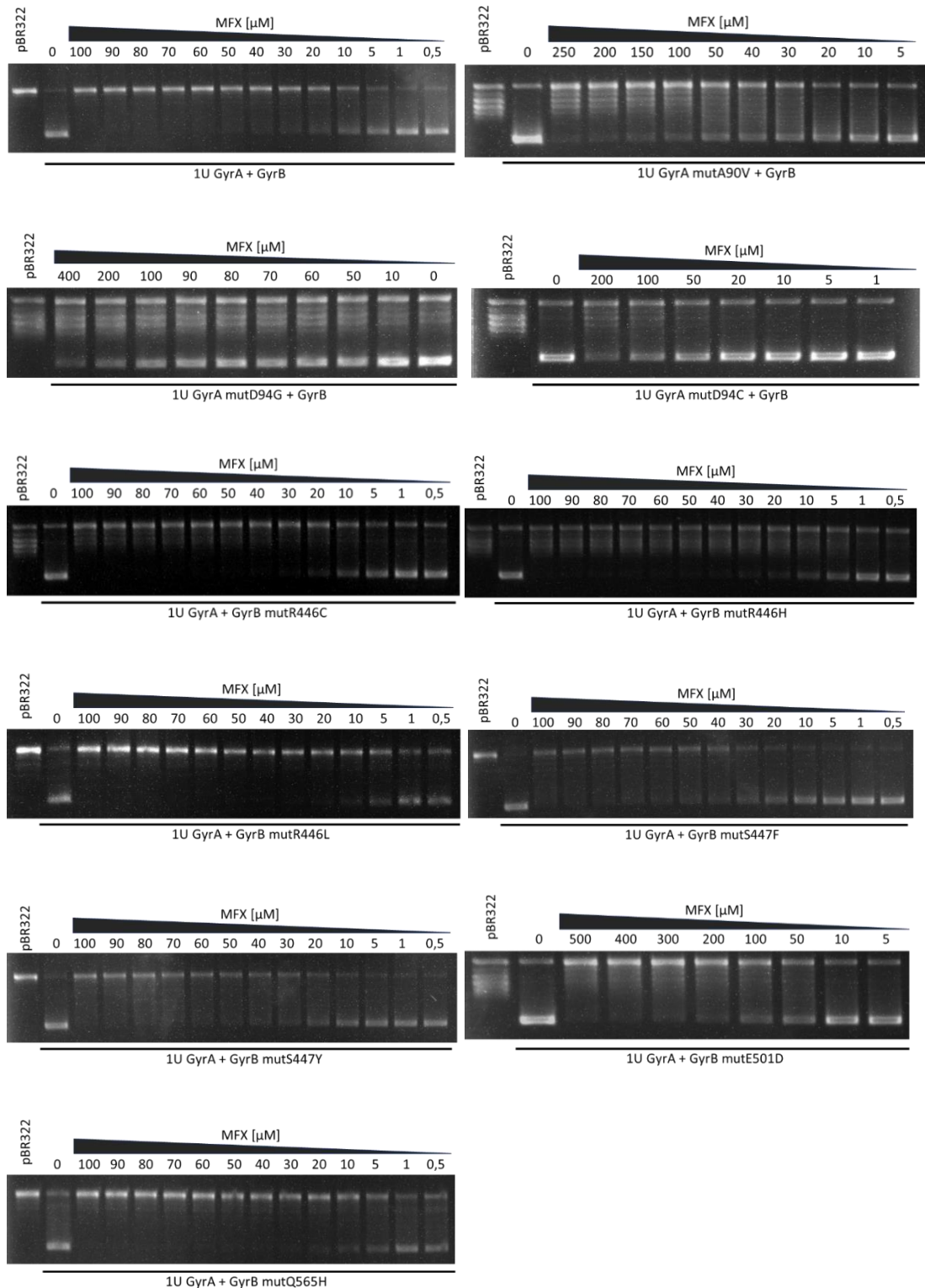


Rycina 4.14 Ocena jednej jednostki aktywności gyrazy DNA na podstawie różnic w migracji form topologicznych plazmidowego DNA pBR322 w żelu agarozowym. PC – kontrola pozytywna, komercyjna gyraza DNA *M. tuberculosis*. (Test dla białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB - Supplement Ryc. S3)

Tabela 4.11 Stężenia gyrazy DNA z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB potencjalnie związanymi z występowaniem lekooporności, odpowiadające jednej jednostce aktywności enzymu w teście superskręcania plazmidowego DNA.

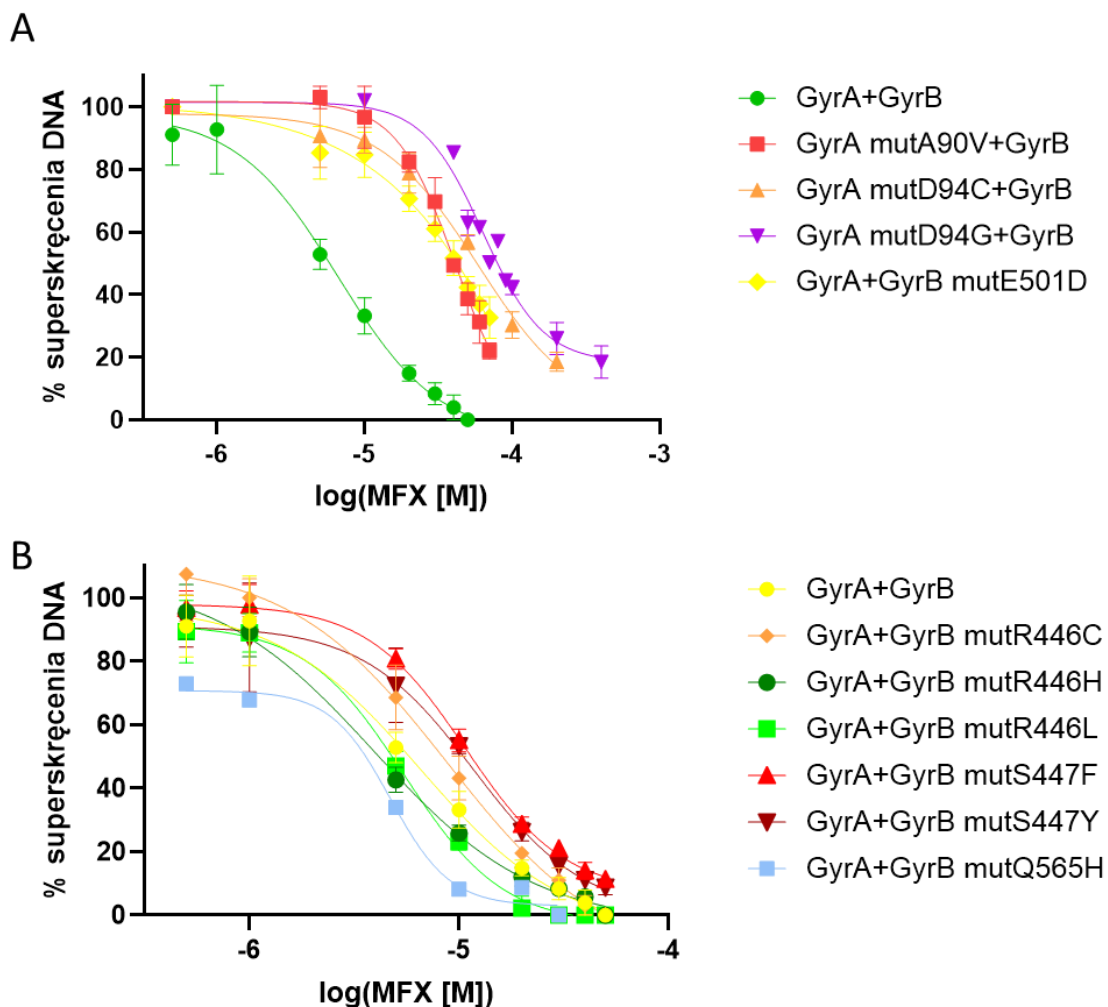
białko	Stężenie odpowiadające 1U [nM]
GyrA + GyrB	7,5
GyrA mutA90V + GyrB	7,5
GyrA mutD94C + GyrB	12
GyrA mutD94G + GyrB	9
GyrA + GyrB mutR446C	15
GyrA + GyrB mutR446H	7,5
GyrA + GyrB mutR446L	120
GyrA + GyrB mutS447F	15
GyrA + GyrB mutS447Y	30
GyrA + GyrB mutE501D	60
GyrA + GyrB mutQ565H	7,5

Kolejno w celu oceny wpływu wybranych substytucji aminokwasowych na pojawianie się lekooporności przeprowadzono test oceniający zdolność gyrazy do wprowadzania superskrętów w plazmidowym DNA - pBR322 w obecności szeregu stężeń moksyflokscyny (MFX) oraz jednej jednostki aktywności białka rekombinowanego (Ryc. 4.15).



Rycina 4.15 Ocena wpływu wybranych substytucji aminokwasowych na pojawianie się lekooporności na moksyflokscynę (MFX). Ocenę przeprowadzono z wykorzystaniem testu superskręcania zrelaksowanego DNA pBR322 w obecności jednej jednostki aktywności białka rekombinowanego oraz wybranych stężeń moksyflokscyny. 0 – kontrola pozytywna, reakcja bez inhibitora.

Aktywność białka oceniano poprzez porównanie wartości  $IC_{50}$  wyznaczonych na podstawie pomiaru densytometrycznego formy superskręconego DNA w obecności szeregu stężeń moksyflokscyny i regresję nieliniową (Ryc. 4.16, Tab. 4.12).



Rycina 4.16 Wykres zależności aktywności gyrazy DNA z wybranymi substytucjami od logarytmu ze stężenia moksyflokscyny (MFX). A) białka rekombinowane z mutacjami warunkującymi znaczny wzrost oporności na moksyflokscynę, B) białka z substytucjami o niewielkim wpływie na aktywność gyrazy w obecności moksyflokscyny w stosunku do formy natywnej. Krzywe dopasowano z wykorzystaniem regresji nieliniowej, czteroparametrowej.

Tabela 4.12 Ocena wartości  $IC_{50}$  moksyflokscyny (MFX) względem gyrazy z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB potencjalnie związanymi z występowaniem lekooporności.

Białko	$IC_{50}$ MFX [ $\mu$ M]
GyrA + GyrB	6,58
GyrA mutA90V + GyrB	43,76
GyrA mutD94C + GyrB	56,08
GyrA mutD94G + GyrB	59,72
GyrA + GyrB mutR446C	8,82
GyrA + GyrB mutR446H	3,93
GyrA + GyrB mutR446L	5,48
GyrA + GyrB mutS447F	10,78
GyrA + GyrB mutS447Y	11,78
GyrA + GyrB mutE501D	40,28
GyrA + GyrB mutQ565H	4,71

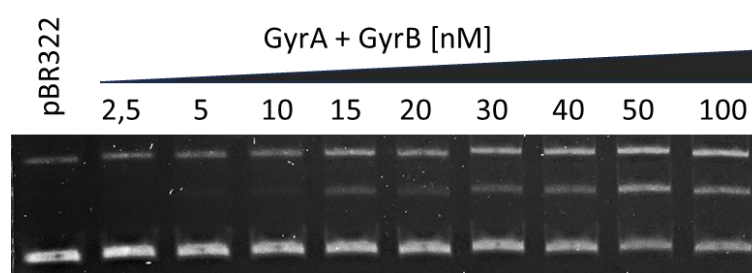
Dla wariantu natywnego GyrA + GyrB obserwowano 50% zahamowanie aktywności enzymu przy 6,58  $\mu$ M moksyflokscyny. W przypadku substytucji w GyrA: mutA90V, mutD94C, mutD94G obserwowano około 8-krotny wzrost wartości  $IC_{50}$ , co potwierdza związek tych substytucji z występowaniem oporności. Dla substytucji w GyrB mutE501D wykazano około 6-krotny wzrost wartości  $IC_{50}$ , a dla substytucji w kodonie 447 (mutS447F, mutS447Y) około 2-krotny wzrost. Dla substytucji w kodonie 446 oraz 565 (mutR446C, mutR446H, mutR446L, mutQ565H) nie odnotowano znaczących w różnic wartości  $IC_{50}$  w odniesieniu do białka natywnego.

#### 4.3.6.4 Ocena stabilizacji kompleksów DNA-enzym w teście cięcia DNA

W celu poznania mechanizmu oporności na MFX skorelowanego z mutacjami w kodonach 446 i 447 GyrB oraz 94 GyrA jako kontroli pozytywnej, przeprowadzono test cięcia DNA (ang. cleavage assay), który umożliwia uwidocznienie dwuniciowych pęknięć w DNA. Po wprowadzeniu cięć w DNA przez gyrazę, inhibitory z grupy fluorochinolonów wiążą się i stabilizują kompleks enzym-DNA, uniemożliwiając ponowne łączenie przeciętego DNA. Test ten umożliwia ocenę, czy wybrane substytucje

aminokwasowe zmniejszają zdolność inhibitora do stabilizacji kompleksu, a zatem wpływają na wzrost oporności.

W pierwszym etapie, w celu ustalenia stężeń rekombinowanych białek do dalszych testów z inhibitorem, przeprowadzono reakcję w obecności jonów wapnia, które stabilizują kompleksy enzymu z przeciętym DNA i hamują ponowne łączenie końców (Ryc. 4.17, Supplement Ryc. S4). Reakcja z jonami wapnia, zamiast z jonami magnezu, umożliwia wskazanie zdolności enzymu do generowania cięć w DNA, niezależnie od obecności antybiotyku.



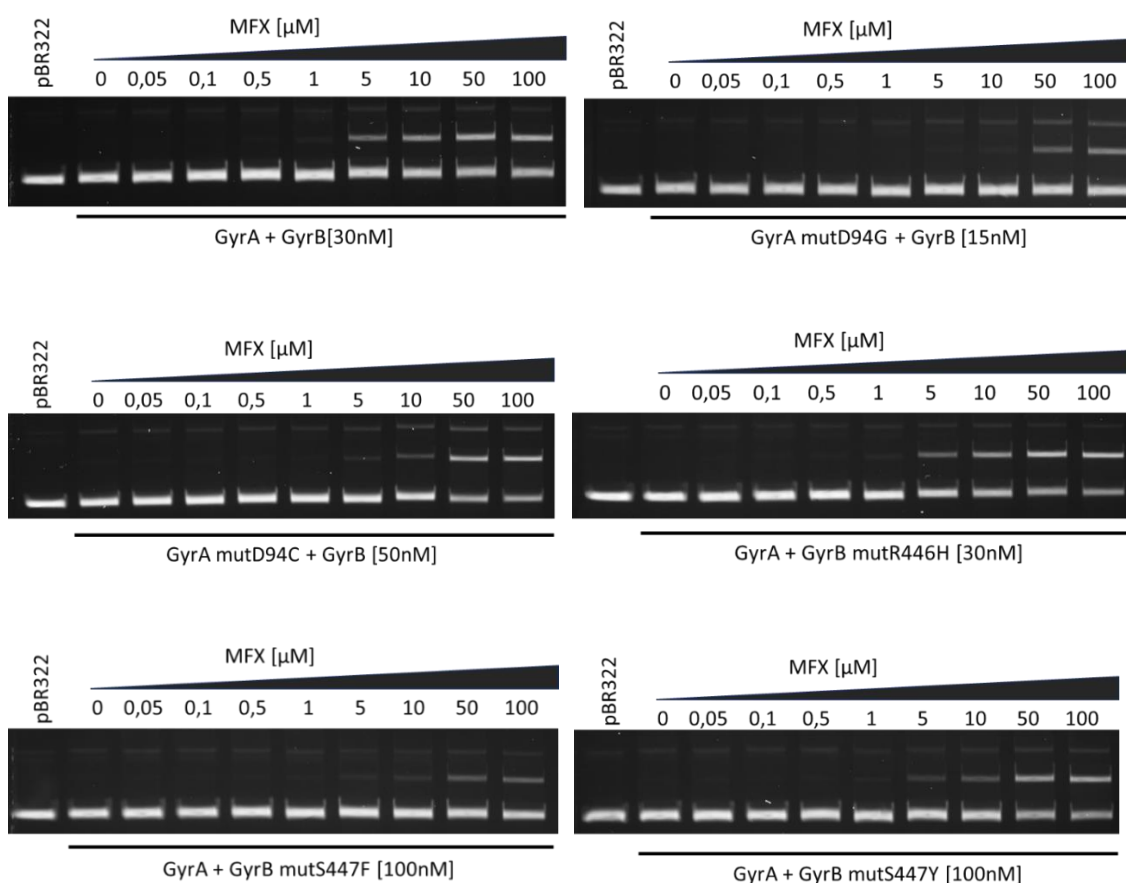
Rycina 4.17 Ocena aktywności gyrazy DNA w teście cięcia superskręconego DNA plazmidowego pBR322 na podstawie stosunku formy liniowej do całkowitej zawartości plazmidowego DNA w żelu agarozowym (Dla białek GyrA i GyrB z substytucjami - Supplement Ryc. S4).

Na podstawie pomiarów densytometrycznych ustalono stężenia gyrazy, przy których zdolność do cięcia DNA wynosiła 10%. Dla natywnej formy gyrazy ustalono stężenie 30 nM, a dla wariantów z substytucjami w GyrA mutD94G i mutD94C, odpowiednio 15 nM i 50 nM. W przypadku białek z substytucjami w GyrB mutR446H, mutS447Y, mutS447F obserwowano znacznie niższą zdolność do cięcia DNA w obecności jonów wapnia, odpowiednio 2,3%; 1,8% i 0,2% nawet w przypadku maksymalnego stężenia białek (100 nM). Z tego względu dla wariantów z substytucją w kodonie 447 wybrano maksymalne stężenie białka odpowiadające 100 nM. Natomiast dla substytucji w kodonie 446 wybrano stężenie 30 nM odpowiadające wariantowi natywnemu, przy którym obserwowano porównywalne wartości maksymalnej obserwowanej aktywności cięcia DNA przy stężeniu 100  $\mu$ M moksyflokscyny (Tab. 4.13). Przy zastosowaniu maksymalnego stężenia 100 nM GyrA+GyrB mutR446H w obecności wysokich stężeń inhibitora, obserwowano zwiększoną aktywność cięcia DNA, co prowadziło do znacznej degradacji kwasów nukleinowych i utrudniało pomiar densytometryczny.

Tabela 4.13 Stężenia gyrazy DNA wybrane w teście cięcia DNA plazmidu pBR322 w obecności jonów wapnia.

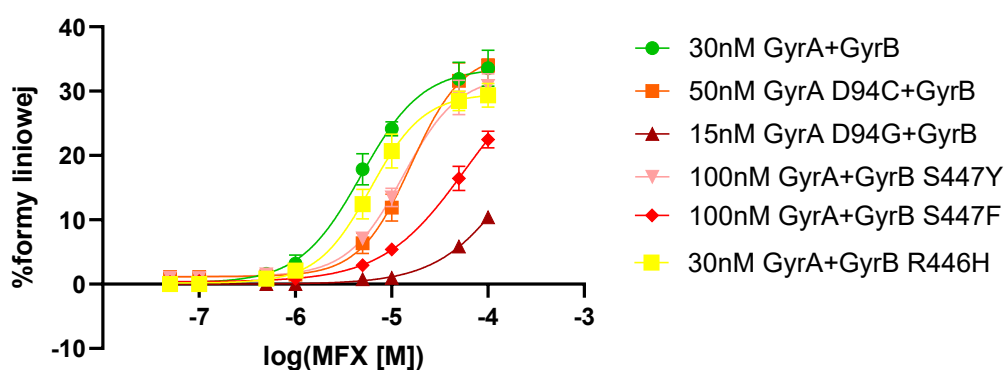
białko	stężenie	% aktywności ± SD
GyrA + GyrB	30 nM	10 ± 1,4
GyrA mutD94C + GyrB	50 nM	10 ± 1
GyrA mutD94G + GyrB	15 nM	10 ± 1,7
GyrA + GyrB mutR446H	30 nM	0,2 ± 0,2
GyrA + GyrB mutS447Y	100 nM	1,8 ± 0,1
GyrA + GyrB mutS447F	100 nM	0,2 ± 0,3

W drugim etapie, po wyborze odpowiednich stężeń białek, przeprowadzono test w obecności jonów magnezu i różnych stężeń inhibitora – moksyflokscyny (Ryc. 4.18).



Rycina 4.18 Ocena aktywności białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB z wykorzystaniem testu cięcia superskręconego DNA plazmidowego w obecności moksyflokscyny (MFX).

Związek wybranych mutacji z pojawieniem się oporności na moksyfloksacynę oceniono przez stabilizację kompleksu DNA-enzym wyznaczając wartości  $CC_{50}$  (ang. half-maximal cleavage concentration, stężenie moksyfloksacyny, przy którym odnotowano 50% maksymalnej aktywności cięcia DNA). Przeprowadzono analizę densytometryczną w celu oceny aktywności enzymu, obliczając stosunek ilości liniowej formy DNA, do całkowitej zawartości DNA, w obecności wybranych stężeń inhibitora w mieszaninie reakcyjnej. Wartości  $CC_{50}$  wyznaczono z wykorzystaniem regresji nieliniowej przy użyciu modelu zależności odpowiedzi (procenta formy liniowej DNA) od logarytmu ze stężenia inhibitora (Ryc. 4.19, Tab. 4.14).



Rycina 4.19 Wykres zależności ilości formy liniowej DNA w teście cięcia przez gyrazy DNA z wybranymi substytucjami od logarytmu ze stężenia moksyfloksacyny (MFX). Krzywe dopasowano z wykorzystaniem regresji nieliniowej, czteroparametrowej.

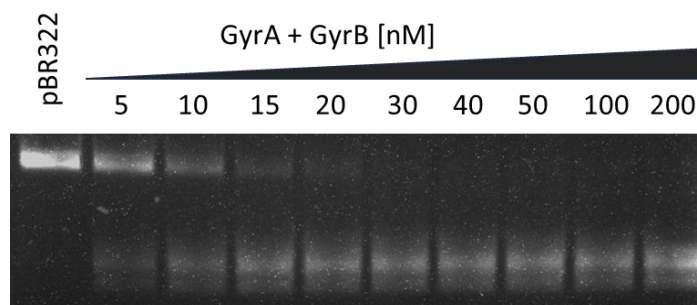
Tabela 4.14 Wartości  $CC_{50}$  moksyfloksacyny ustalone na podstawie testu cięcia DNA przez pomiar densytometryczny i ocenę stosunku ilości liniowej formy do całkowitej zawartości DNA z wykorzystaniem regresji nieliniowej.

białko	Stężenie białka	$CC_{50}$ [ $\mu$ M]	Maksymalna obserwowana aktywność [%]	Maksymalna aktywność przy stężeniu MFX [ $\mu$ M]
GyrA + GyrB	30 nM	4,8	$33,6 \pm 2,8$	100
GyrA mutD94C + GyrB	50 nM	15,9	$34 \pm 1$	100
GyrA mutD94G + GyrB	15 nM	196,2	$10,5 \pm 0,9$	100
GyrA + GyrB mutR446H	30 nM	6,0	$29,3 \pm 1,8$	100
GyrA + GyrB mutS447Y	100 nM	13,1	$30,8 \pm 1,9$	100
GyrA + GyrB mutS447F	100 nM	57,5	$22,5 \pm 1,3$	100

Analiza wykazała około 3-krotny wzrost wartości  $CC_{50}$  w przypadku substytucji mutD94C w GyrA oraz mutS447Y w GyrB w stosunku do formy natywnej. Dla wariantów stanowiących kontrolę pozytywną: mutD94G w GyrA oraz mutS447F w GyrB obserwowano odpowiednio 40-krotny i 12-krotny wzrost wartości  $CC_{50}$ . Dla wariantu z substytucją mutR446H w GyrB nie zaobserwowano istotnych zmian mogących wskazywać na występowanie oporności. Dodatkowo zaobserwowano mniejszą aktywność białek z substytucjami w kodonach 446 i 447 (mutR446H, mutS447F, mutS447Y) GyrB do wprowadzania cięć w DNA bez zdolności do ich ponownego łączenia w teście z jonami wapnia.

#### 4.3.6.5 Ocena dekatencji DNA

W celu określenia czy i w jaki sposób wybrane mutacje w kodonach 446, 447 oraz 565 GyrB (wybranych w analizach bioinformatycznych jako miejsca będące pod działaniem doboru różnicującego, ale warunkujących niższy poziom lub brak oporności na fluorochinolony) wpływają na dekatencję DNA, przeprowadzono test *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanych białek i substratu – splecionych pojedynczym wiązaniem, dwóch cząsteczek plazmidowego DNA. Dekatencja DNA polega na rozpleceniu połączonych ze sobą katenatów, dzięki czemu możliwy jest prawidłowy rozdział materiału genetycznego do komórek potomnych. Ze względu na brak topoizomerazy IV u *M. tuberculosis* funkcję dekatencji DNA pełni gyraza. W pierwszym etapie ustalono jedną jednostkę aktywności enzymu, która odpowiadała stężeniu gyrazy, przy którym obserwowano aktywność dekatencji w minimum 95% (Ryc. 4.20, Supplement Ryc. S5).



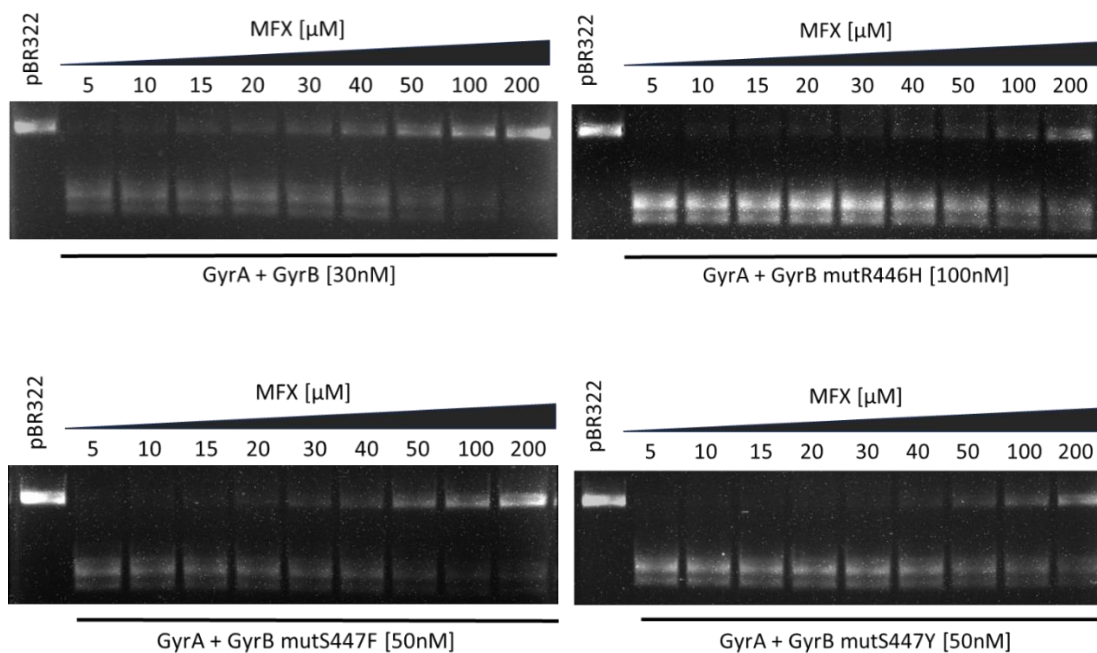
Rycina 4.20 Ocena dekatencji DNA z zastosowaniem białek rekombinowanych GyrA i GyrB (warianty z substytucjami w kodonach GyrB Supplement Ryc. S5).

Dla białka natywnego ustalono 1 U przy stężeniu 30 nM, a dla wariantów z substytucjami w GyrB, które wpływają na wzrost lekooporności, pełna dekatencja substratu wymagała wyższych stężeń enzymu: 100 nM dla mutR446H, 50 nM dla mutS447F, 100 nM dla mutS447Y (Tab. 4.15). Substytucja w kodonie 565 GyrB, która na podstawie analiz bioinformatycznych, została zidentyfikowana jako będąca tuż pod progiem prawdopodobieństwa występowania doboru różnicującego, nie wpływała na wzrost oporności na fluorochinolony, powodowała nieznaczny wzrost zdolności enzymu do dekatencji DNA w porównaniu do wariantu natywnego (Tab. 4.15). Ocenę przeprowadzono na podstawie stosunku formy po dekatencji do całkowitej zawartości substratu w żelu agarozowym.

Tabela 4.15 Stężenia wybranych białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach pod dobozem różnicującym odpowiadające jednej jednostce aktywności enzymu w teście dekatencji DNA.

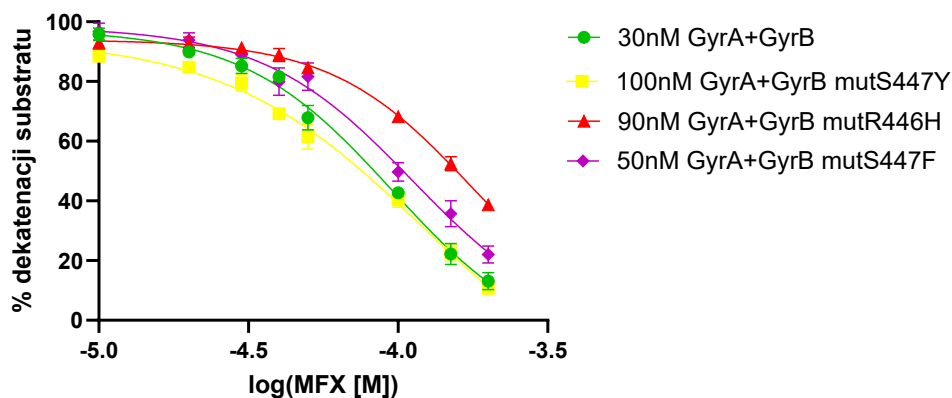
białko	jedna jednostka aktywności 1 U [nM]
GyrA + GyrB	30
GyrA + GyrB mutR446H	100
GyrA + GyrB mutS447F	50
GyrA + GyrB mutS447Y	100
GyrA + GyrB mutQ565H	20

Ponownie po ustaleniu jednej jednostki aktywności enzymów przystąpiono do testów dekatencji w obecności inhibitora (moksyflokscyny) w celu sprawdzenia związku obecności mutacji z występowaniem oporności na fluorochinolony (Ryc. 4.21). Ocenę przeprowadzono na podstawie pomiarów densytometrycznych, poprzez wyznaczenie wartości  $IC_{50}$ , czyli stężenia moksyflokscyny, które powodowało zahamowanie zdolności enzymu do dekatencji w 50%.



Rycina 4.21 Ocena aktywności białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach GyrB w obecności moksyflokscyny (MFX) w teście dekatencji DNA.

Wartości  $IC_{50}$  wyznaczono z wykorzystaniem regresji nieliniowej przy użyciu modelu zależności odpowiedzi (procenta substratu po dekatencji) od logarytmu ze stężenia inhibitora (Ryc. 4.22, Tab. 4.16).



Rycina 4.22 Wykres zależności ilości DNA po dekatencji w teście dekatencji DNA przez gyrazy z wybranymi substytucjami od logarytmu ze stężenia moksyflokscyny (MFX). Krzywe dopasowano z wykorzystaniem regresji nieliniowej, czteroparametrowej.

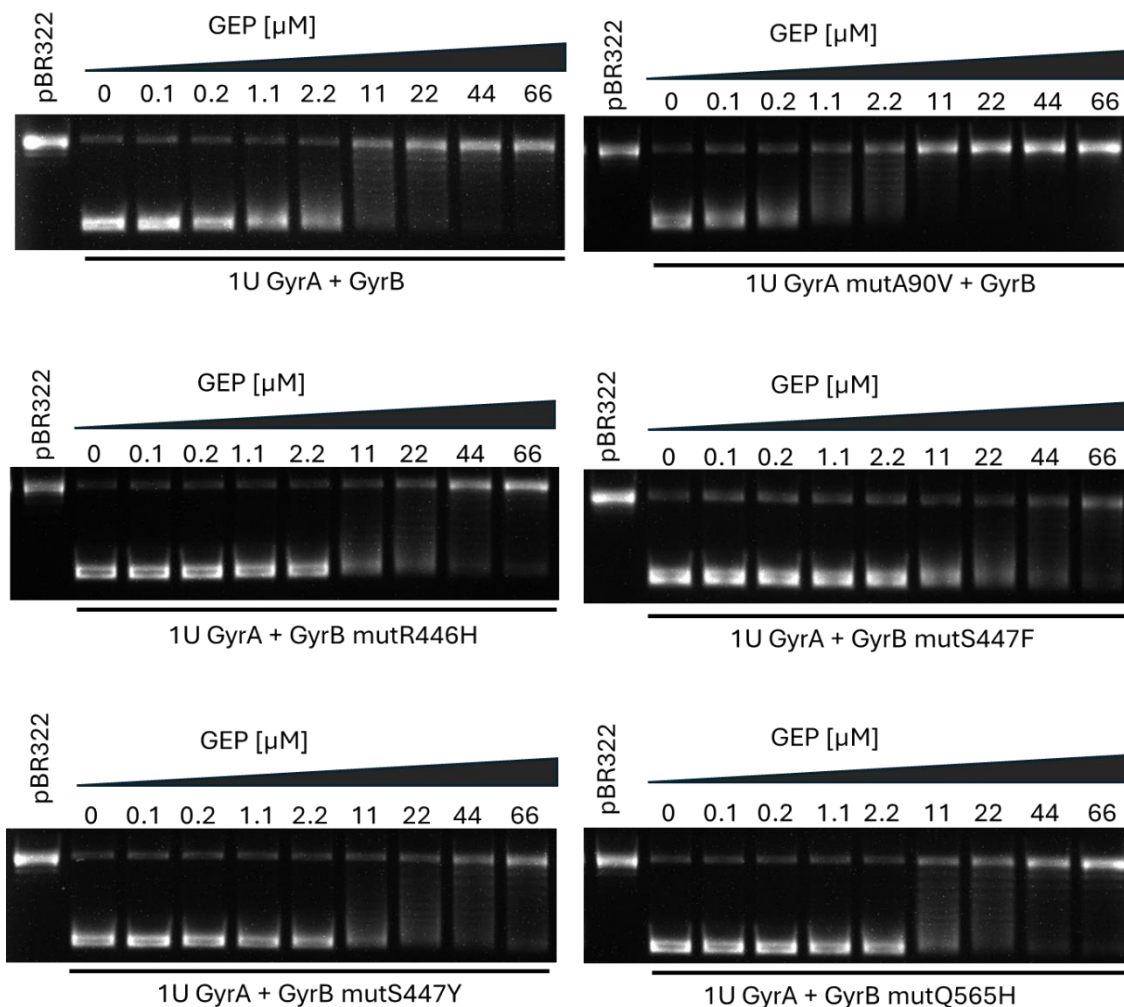
Tabela 4.16 Wartości IC<sub>50</sub> moksyflokscyny ustalone na podstawie testu dekatencji DNA przez pomiar densytometryczny i ocenę stosunku ilości formy po dekatencji do całkowitej zawartości DNA z wykorzystaniem regresji nieliniowej, czteroparametrowej.

białko	Stężenie białka [nM]	IC <sub>50</sub> [μM]
GyrA + GyrB	30	95,49
GyrA + GyrB mutR446H	100	174
GyrA + GyrB mutS447F	50	111,7
GyrA + GyrB mutS447Y	100	122

W przypadku substytucji mutR446H w GyrB zaobserwowano prawie 2-krotny wzrost wartości IC<sub>50</sub> w stosunku do białka natywnego, co wskazuje na występowanie lekooporności na moksyflokscynę w tym teście. Dla substytucji w kodonie 447 (mutS447F oraz mutS447Y) GyrB odnotowano niewielki wzrost wartości IC<sub>50</sub> (Tab. 4.16).

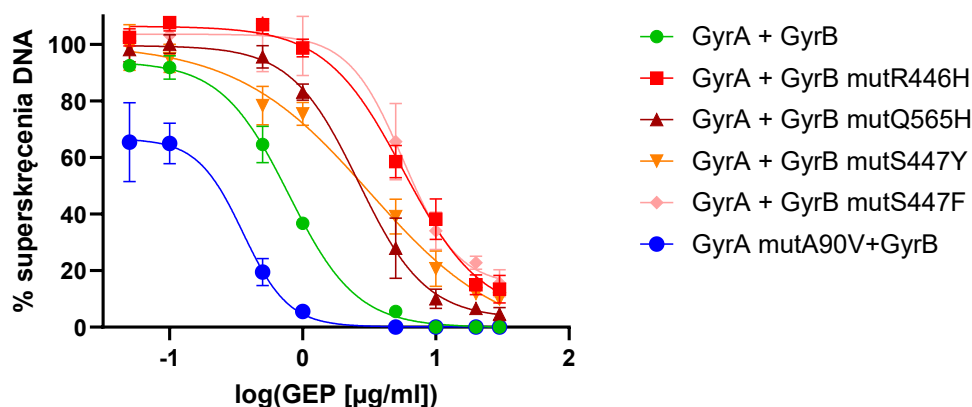
#### 4.3.6.6 Wpływ gepotidacyny na aktywność białek rekombinowanych

Dla wybranych białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach pod dobozem różnicującym oceniono wpływ związku z grupy NBTI na aktywność gyraz. Do testów wybrano rekombinowane białka: GyrA mutA90V (zwiększona wrażliwość na gepotidacynę w teście MABA) oraz GyrB z substytucjami w kodonach 446, 447 o niewyjaśnionym związku z lekoopornością na MFX w testach *in vitro* oraz z substytucją w kodonie 565 GyrB, która nie wpływała na wzrost lekooporności. Kontrolę stanowiło białko natywne bez mutacji. Ocenę aktywności gyrazy przeprowadzono z wykorzystaniem testu superskręcania plazmidowego DNA pBR322 (Ryc. 4.23).



Rycina 4.23 Ocena wartości  $IC_{50}$  gepotidacyliny względem gyrazy z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB. Ocenę przeprowadzono w teście superskręcania zrelaksowanego DNA plazmidu pBR322 przez jedną jednostkę aktywności rekombinowanego białka oraz wybranych stężeń gepotidacyliny.

Wartość  $IC_{50}$  wyznaczono po pomiarze densytometrycznym formy superskręconego DNA po reakcji superskręcania w obecności szeregu stężeń gepotidacyliny na obrazie żeli agarozowych i przeliczono jako procent w stosunku do pomiaru w reakcji bez inhibitora. Następnie wykorzystano regresję nieliniową, czteroparametrową przy zależności procentowej aktywności enzymu od logarytmu ze stężenia inhibitora (Ryc. 4.24, Tab. 4.17).



Rycina 4.24 Wykres zależności aktywności gyrazy DNA z wybranymi substytucjami od logarytmu ze stężenia gepotidacyny (GEP). Krzywe dopasowano z wykorzystaniem regresji nieliniowej, czteroparametrowej.

Tabela 4.17 Ocena wartości IC<sub>50</sub> gepotidacyny względem gyrazy z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB w teście superskręcania DNA pBR322.

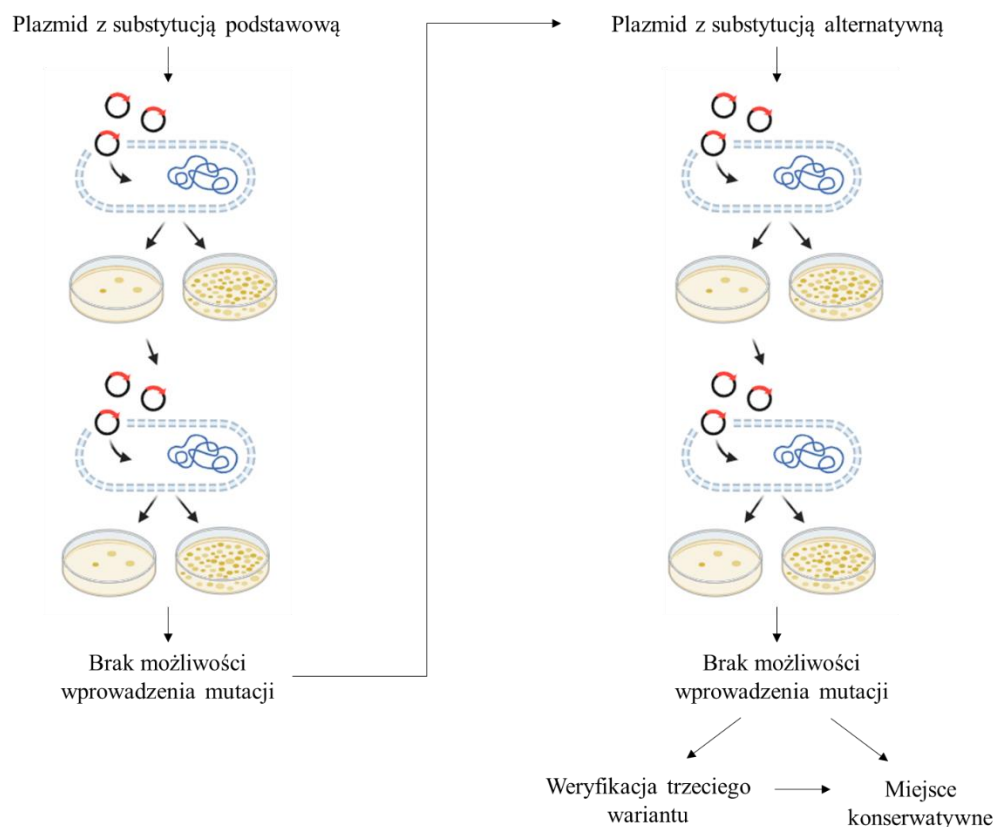
białko	IC <sub>50</sub> μM
GyrA + GyrB	1,56
GyrA mutA90V+GyrB	0,80
GyrA + GyrB mutR446H	12,73
GyrA + GyrB mutS447Y	7,09
GyrA + GyrB mutS447F	12,66
GyrA + GyrB mutQ565H	5,84

Dla wariantu natywnego wartość IC<sub>50</sub> gepotidacyny wyniosła 1,56 μM. W przypadku wariantu mutQ565H w GyrB, który nie wpływał na wzrost oporności względem fluorochinolonów obserwowano ponad 3-krotny wzrost wartości IC<sub>50</sub>, a dla wariantu z substytucją mutS447Y w GyrB 4-krotny wzrost. Największym poziomem oporności względem gepotidacyny w tym teście charakteryzowały się gyrazy z substytucjami mutR446H oraz mutS447F GyrB, gdzie należało użyć ponad 7-krotnie wyższego stężenia gepotidacyny do zahamowania aktywności enzymu w 50%. W przypadku substytucji mutA90V w GyrA, związanej z występowaniem oporności na fluorochinolony, potwierdzono zwiększoną wrażliwość tego wariantu na gepotidacynę w stosunku do formy natywnej, a nawet najniższe stężenia związku (0,1 μM) powodowały spadek aktywności enzymu.

#### **4.4 Ocena wpływu mutacji punktowych w kodonach gyrazy będących pod doborem oczyszczającym na funkcjonowanie komórek *M. tuberculosis* oraz aktywność białek GyrA i GyrB**

##### **4.4.1 Wybór miejsc konserwatywnych w kodonach gyrazy *M. tuberculosis*.**

Potencjalne miejsca konserwatywne w gyrazie prątka gruźlicy zostały wybrane na podstawie analiz bioinformatycznych poprzez określenie kodonów będących pod wpływem działania doboru oczyszczającego. W celu weryfikacji konserwatywności kodonów podjęto próby wprowadzenia do genomu *M. tuberculosis* mutacji wybranych na podstawie analizy narzędziem PredictSNP, gdzie zidentyfikowano substytucje, które nie wpływały negatywnie na aktywność białka lub wpływ ten był jak najmniejszy. W pierwszym etapie przygotowano plazmidy pMV306-Km<sup>R</sup> z wklonowanymi genami *gyrA* lub *gyrB*, do których wprowadzono wybrane mutacje punktowe przez zastosowanie mutagenyzy punktowej (Metody 3.5.11). Plazmidy te posłużyły do transformacji szczepów modelowych *M. tuberculosis*  $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  i oceny możliwości wprowadzenia mutacji w danym miejscu. Obecność wybranych mutacji punktowych w szczepach *M. tuberculosis* sprawdzano przez amplifikację fragmentów genu *gyrA* i *gyrB* zawierających analizowane mutacje punktowe, z wykorzystaniem odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych (Metody 3.4.1, Tab. 3.8) i sekwencjonowanie metodą Sangera. Dokonywano dwóch prób transformacji, a z każdej próby sekwencjonowano minimum po 3 transformanty. W przypadku braku możliwości otrzymania mutantu sprawdzano możliwość otrzymania alternatywnej substytucji, innym aminokwasem. Dla niektórych z wariantów zastosowano dodatkowe kryterium i weryfikowano możliwość wprowadzenia mutacji w danym kodonie powodującej zamianę na trzy różne aminokwasy: dwie substytucje wybrane na podstawie analiz bioinformatycznych oraz substytucja aminokwasem z tej samej grupy uwzględniając charakter chemiczny aminokwasów (Ryc. 4.25).



Rycina 4.25 Schemat przedstawiający etapy oceny konserwatywności kodonów *gyrA* oraz *gyrB*, wybranych w analizach bioinformatycznych jako miejsca pod doborem oczyszczającym

Spośród 32 kodonów *gyrA* oraz *gyrB* wytypowanych w analizie wzorcowania ewolucyjnego dla 7 z nich nie było możliwości wprowadzenia mutacji, a dla pozostałych 25 miejsc otrzymano mutanty *M. tuberculosis* (Tab. 4.18).

Tabela 4.18 Analiza konserwatywności kodonów *gyrA* oraz *gyrB*, wytypowanych w analizach bioinformatycznych jako miejsca pod doborem oczyszczającym, przez wprowadzenie wybranych mutacji do genomu *M. tuberculosis*.

Gen	Numer kodonu	Uzyskane mutanty	Brak możliwości uzyskania mutantu	Kodony uznane za wysoce konserwatywne
<i>gyrA</i>	131	-	E131A, E131L, E131D	131
	162	E162Q	-	-
	196	E196D	-	-
	368	H368F	-	-

	447	E447Q	-	-
	482	E482D	-	-
<i>gyrB</i>	22	G22S	-	-
	24	E24D	-	-
	41	-	G41A, G41S	41
	48	-	E48D, E48Q	48
	60	G60S	G60A	
	114		Y114F, Y114W, Y114V	114
	118	G118A	-	-
	122		G122A, G122S	122
	143	G143N	-	-
	168	G168A	-	-
	176	D176S	-	-
	193	R193K	-	-
	210	D210E	-	-
	256	G256A	-	-
	318	E318Q	E318D	-
	341	K341R	-	-
	347	-	G347N, G347T, G347A	347
	352	E352D	-	-
	353	-	G353A, G353S	353
	374	K374R	-	-
	420	A420S	-	-
	524	Y524F	-	-
	565	Q565H	-	-
	584	D584E	-	-
594	G594A	-	-	
620	E620Q	E620D	-	
646	E646D	-	-	

Na podstawie tej analizy jako miejsca wysoce konserwatywne wybrano kodony: 41, 48, 114, 122, 347, 353 w *gyrB* oraz 131 w *gyrA*.

Ze względu na możliwość otrzymania 25 szczepów z substytucjami w kodonach pod doborem oczyszczającym oceniono wpływ obecności mutacji w tych kodonach na ich wrażliwość na fluorochinolony metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym z użyciem odczynnika Alamar Blue. Cztery szczepy z mutacjami w kodonach 118, 352, 420, 620 *gyrB* wykazywały zwiększoną wrażliwość na pięć fluorochinolonów (moksyflokscynę, ofloksacynę, ciprofloksacynę, gatiflokscynę, lewoflokscynę), a szczepy z mutacjami w kodonach 162 *gyrA* oraz 256, 318, 584, 594 *gyrB* były bardziej wrażliwe względem tylko niektórych fluorochinolonów. Wartości MIC dla większości otrzymanych szczepów (16) były równe wartościom szczepów kontrolnych bez mutacji (Tab. 4.19).

Tabela 4.19 Ocena wartości MIC fluorochinolonów: ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), lewoflokscyny (LFX), moksyflokscyny (MFX) i gatiflokscyny (GFX) metodą mikrorozcieńczeń i odczynnika AlamarBlue dla wybranych szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi w kodonach pod doborem oczyszczającym.

szczep	MFX [µg/ml]	OFX [µg/ml]	CIP [µg/ml]	GFX [µg/ml]	LFX [µg/ml]
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i>	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i>	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i> E162Q	0,03125	0,25	0,125	0,03125	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i> E196D	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i> H368F	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i> E447Q	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrA/attB::gyrA</i> E482D	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G22S	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> E24D	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G60S	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G118A	0,03125	0,25	0,125	0,03125	0,125
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G143N	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G168A	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> D176S	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> R193K	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> D210E	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> G256A	0,0625	0,25	0,125	0,0625	0,25
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> E318Q	0,03125	0,25	0,25	0,03125	0,125
$\Delta$ <i>gyrB/attB::gyrB</i> K341R	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25

$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E352D	0,03125	0,25	0,125	0,03125	0,125
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ K374R	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ A420S	0,01563	0,125	0,0625	0,015625	0,0625
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ Y524F	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ D584E	0,0625	0,25	0,25	0,03125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ G594A	0,0625	0,25	0,125	0,03125	0,125
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E620Q	0,03125	0,25	0,125	0,03125	0,125
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E646D	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25

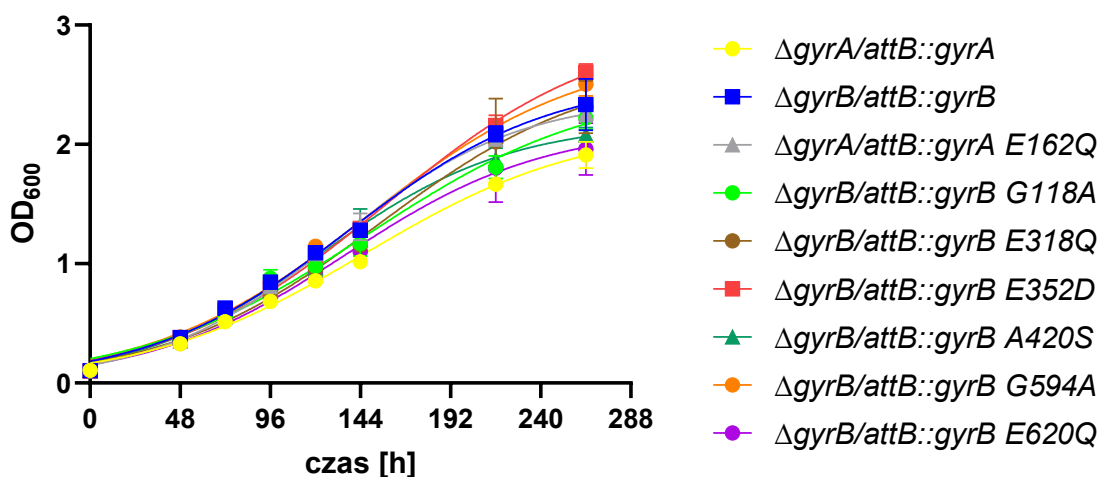
Dla siedmiu szczepów wykazujących wrażliwość na minimum cztery antybiotyki z grupy fluorochinolonów przeprowadzono dodatkowo ocenę ich wrażliwości w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, za pomocą metody mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i wzrostu szczepów w postaci osadu komórkowego (Tab. 4.20).

Tabela 4.20 Ocena wartości MIC fluorochinolonów: ciprofloksacyny (CIP), ofloksacyny (OFX), lewofloksacyny (LFX), moksyfloksacyny (MFX) i gatifloksacyny (GFX) metodą mikrorozcieńczeń i oceny obecności osadu komórkowego dla wybranych szczepów *M. tuberculosis* z mutacjami punktowymi w kodonach pod doбором oczyszczającym. Badanie przeprowadzono w Krajowym Referencyjnym Laboratorium Prętka w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

szczep	MFX [μg/ml]	OFX [μg/ml]	CIP [μg/ml]	GFX [μg/ml]	LFX [μg/ml]
$\Delta gyrA/attB::gyrA$	0,125	1	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$	0,125	1	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ E162Q	0,0625	0,5	0,25	0,0625	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ G118A	0,125	0,5	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E318Q	0,125	1	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E352D	0,0625	0,5	0,125	0,0625	0,125
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ A420S	0,0625	0,25	0,125	0,0625	0,125
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ G594A	0,125	0,5	0,25	0,125	0,25
$\Delta gyrB/attB::gyrB$ E620Q	0,125	0,5	0,25	0,0625	0,125

Dla szczepu z mutacją w kodonie 318 *gyrB* nie wykazano różnic w wartości MIC względem szczepów kontrolnych. Szczepy z mutacjami w kodonie 352 oraz 420 ponownie wykazały zwiększony poziom wrażliwości na pięć fluorochinolonów, a pozostałe cztery szczepy wykazywały zwiększoną wrażliwość na wybrane fluorochinolony.

W celu oceny wpływu mutacji na tempo wzrostu szczepów oraz potencjalny związek spowolnionego wzrostu z występowaniem nadwrażliwości, przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu dla szczepów o niższych wartościach MIC fluorochinolonów w stosunku do szczepu bez mutacji. Analizę przeprowadzono poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli na podłożu bogatym w siedmiu punktach czasowych: 48, 72, 96, 120, 144, 216 i 264 godzin (Ryc. 4.26).



Rycina 4.26 Analiza tempa wzrostu szczepów z mutacjami w kodonach genów *gyrA* oraz *gyrB* wybranych w analizach *in silico* jako miejsca pod doбором oczyszczającym. Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem testu t-studenta dla prób niesparowanych przy poziomie istotności  $\alpha=0,05$  w programie GraphPad.

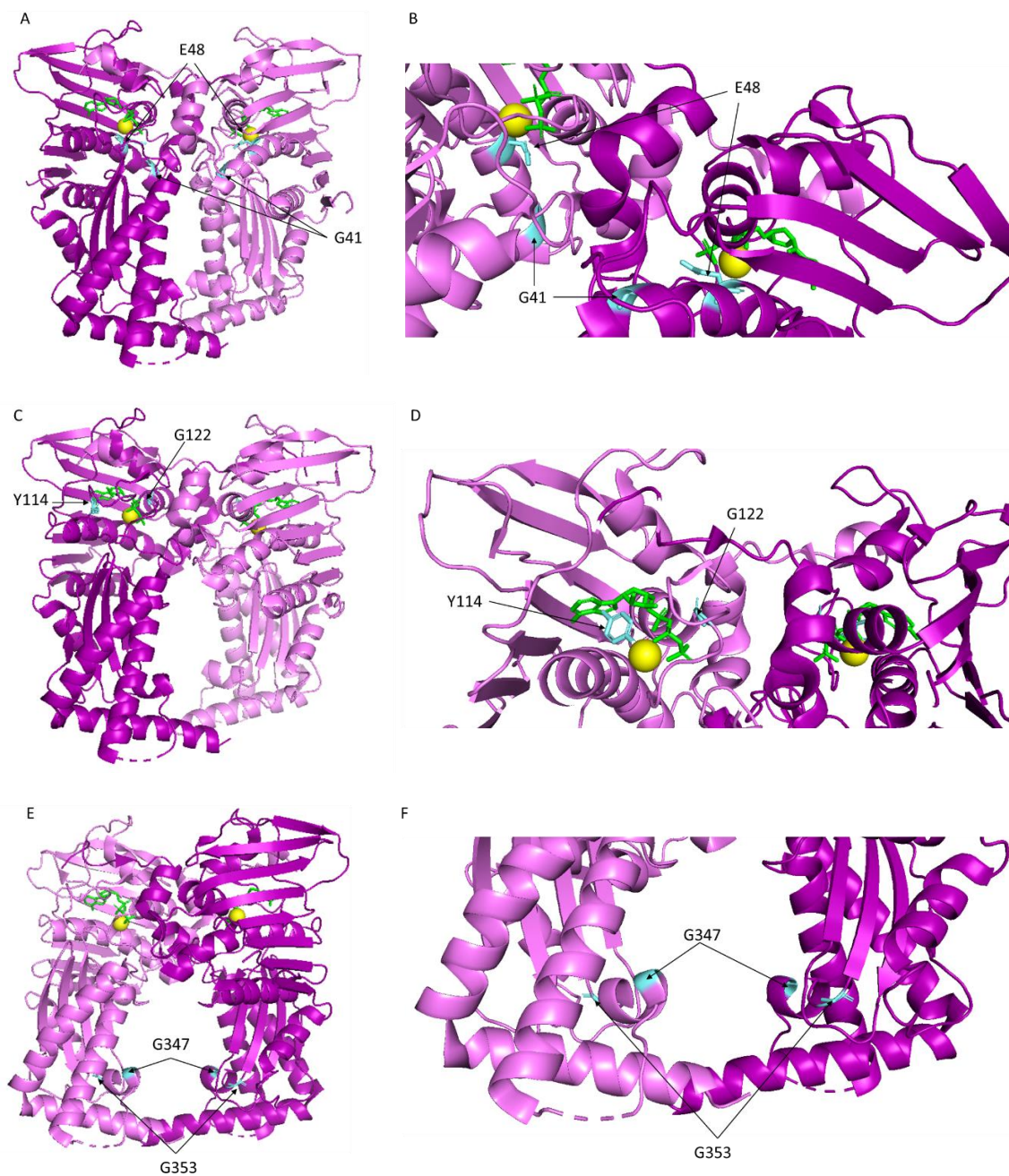
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w tempie wzrostu szczepów z mutacjami E162Q w *gyrA* oraz G118A, E318Q, E352D, A420S, G594A, E620Q w *gyrB*.

#### 4.4.2 Weryfikacja wpływu substytucji w kodonach pod doбором oczyszczającym na aktywność rekombinowanych białek GyrA i GyrB

##### 4.4.2.1 Umieszczenie konserwatywnych kodonów w kryształach gyrazy DNA

Zidentyfikowane konserwatywne kodony 41, 48, 114, 122, 347 oraz 353 GyrB umiejscowione są w N-końcowej domenie ATPazowej (Wstęp 1.3.2, Ryc. 1.7). Pierwsze cztery znajdują się w poddomenie GHKL i odpowiadają za wiązanie lub tworzenie

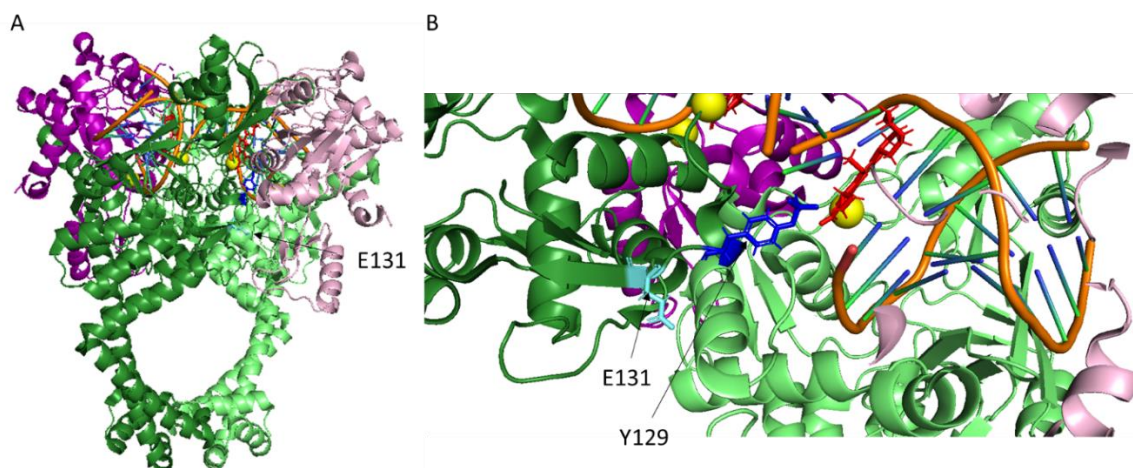
kieszeni dla ATP<sup>45</sup>. Z kolei kodony 347 i 353 są częścią poddomeny transducer, która umożliwia wprowadzanie zmian konformacyjnych enzymu (Ryc. 4.27)<sup>104</sup>.



Rycina 4.27 Schemat struktury przestrzennej domeny ATPazowej gyrazy DNA *M. tuberculosis* (fioletowy) z cząsteczką AMPPN - analogu ATP (zielony) w obecności jonów magnezu (żółty) z zaznaczonymi kodonami 41, 48 (A, B), 114, 122 (C, D) oraz 347 i 353 (E, F) w GyrB zidentyfikowanych jako miejsca konserwatywne. Kryształ 3ZKD (A, B, C, D, E, F) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

Wytypowany podczas analizy konserwatywny kodon podjednostki A gyrazy DNA - 131 umiejscowiony jest w obrębie domeny N-końcowej BRD, a dokładniej

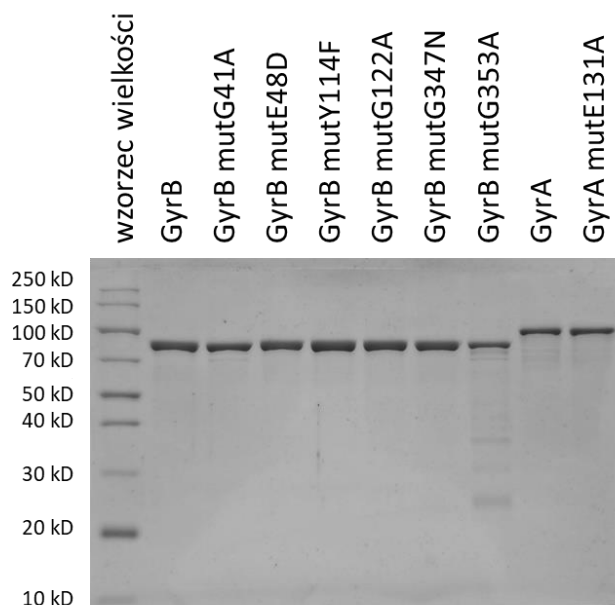
w poddomenie WHD blisko katalitycznych reszt aminokwasowych (R128, Y129) odpowiedzialnych za tworzenie pęknięcia i wiązanie z DNA (Ryc. 4.28)<sup>45</sup>. Kodon ten może uczestniczyć w tworzeniu bramki DNA gyrazy *M. tuberculosis*.



Rycina 4.28 Schemat struktury przestrzennej gyrazy DNA *M. tuberculosis* (podjednostka GyrA – zielony, podjednostka GyrB – fioletowy) z fragmentem DNA o długości 24 nukleotydów (pomarańczowy) w obecności moksyflokscyny (czerwony) i jonów magnezu (żółty) z zaznaczonymi kodonami E131 (jasnoniebieski) i katalityczną resztą tyrozynową Y129 (ciemnoniebieski) w GyrA. Kryształ 5BTA (A, B) pobrano z bazy PDB<sup>27</sup> i opracowano z wykorzystaniem programu PyMOL.

#### 4.4.2.2 Oczyszczanie rekombinowanych białek

W celu weryfikacji znaczenia wybranych miejsc konserwatywnych w aktywności gyrazy DNA, otrzymano białka rekombinowane GyrA z substytucją w kodonie 131 oraz GyrB z substytucjami w kodonach 41, 48, 114, 122, 347, 353. Do nadprodukcji rekombinowanych białek wykorzystano system ekspresyjny *E. coli* oraz plazmidy pHis.parallel1 z wklonowanymi genami *gyrA* lub *gyrB*, do których przez mutagenezę punktową wprowadzono mutacje (E131A w *gyrA* oraz G41A, E48D, Y114F, G122A, G347N, G353A w *gyrB*). Następnie białka oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa (Suplement Ryc. S6) oraz filtracji żelowej (Ryc. 4.29).

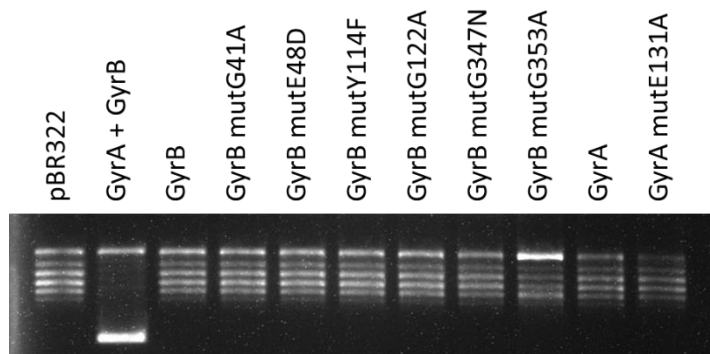


Rycina 4.29 Preparaty białkowe (2  $\mu$ g) GyrA oraz GyrB z substytucjami w kodonach wybranych jako miejsca konserwatywne (oczyszczone z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa oraz żelowej wykluczenia) po rozdziale w 12% żelu poliakrylamidowym.

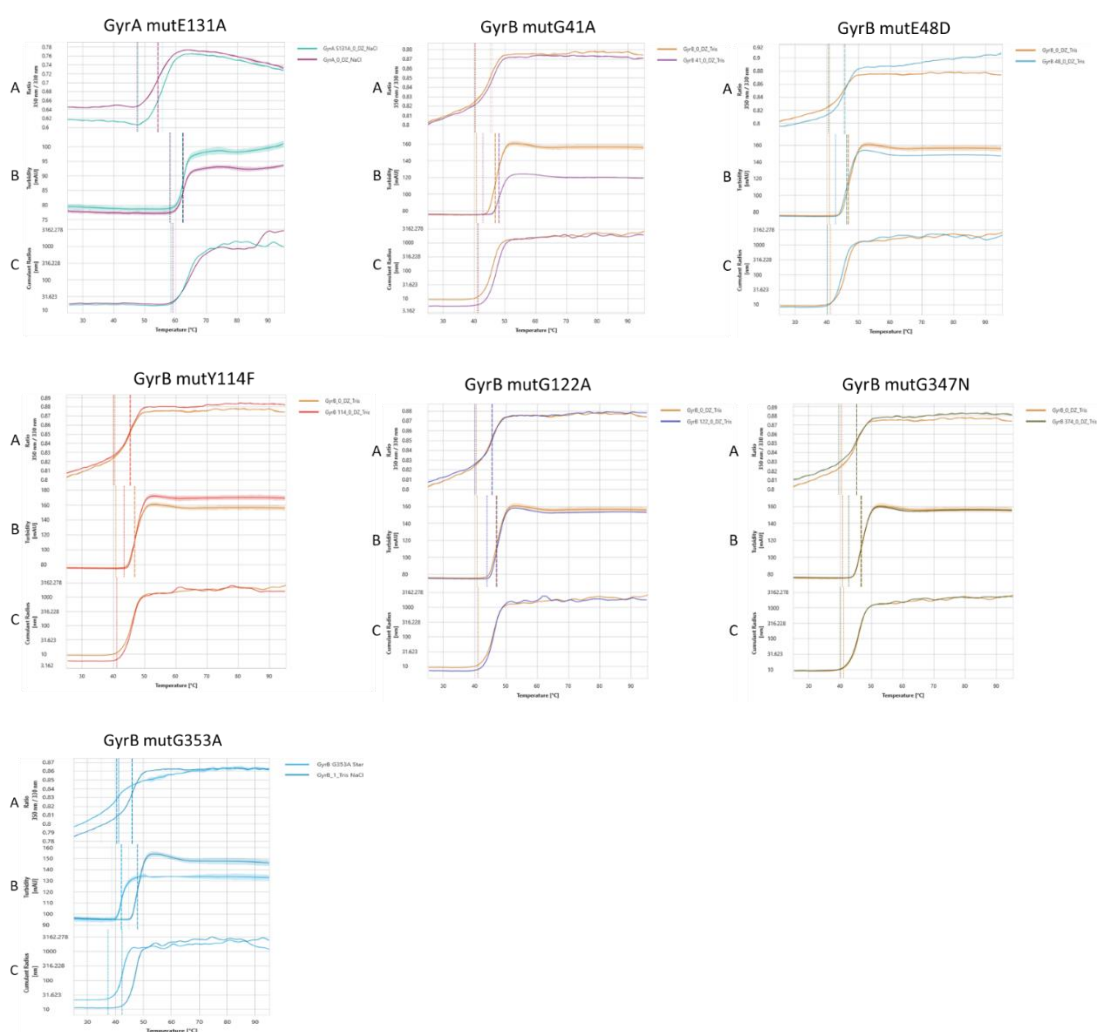
Dodatkowo w celu oceny zanieczyszczeń preparatów białkowych nukleazami lub podjednostkami gyrazy pochodzącymi ze szczepu *E. coli* i wykluczenia fałszywie pozytywnych wyników, przeprowadzono test aktywności gyrazy, polegający na wprowadzaniu superskrętów w zrelaksowanym DNA plazmidu pBR322, w obecności jednej podjednostki białka (Ryc. 4.30).

Dla białka z substytucją mutG353A w GyrB w teście zaobserwowano zwiększoną zawartość formy kolistej plazmidu, jednak ze względu na trudności w otrzymaniu tego wariantu GyrB zdecydowano o kontynuacji dalszych badań z tym preparatem białkowym. Dla wariantu białka z substytucją E131A w GyrA, które jako jedyne białko z substytucją w miejscu konserwatywnym zachowało aktywność, została również oceniona obecność nukleaz w teście cięcia DNA i stabilizacji dwuniciowych pęknięć, gdzie nie odnotowano obecności zanieczyszczeń (Ryc. 4.12).

Badane białka z założenia miały nie wykazywać aktywności, więc istotnym było wykazanie, że brak aktywności wynika z wprowadzonej substytucji, a nie z nieprawidłowego sfałdowania. Prawidłowe fałdowanie białek oceniono wykorzystując system Prometheus Panta (NanoTemper) (Ryc.4.31).



Rycina 4.30 Test zdolności do wprowadzania superskrętów w plazmidowym DNA (pBR322) w obecności 50  $\mu\text{g/ml}$  podjednostki GyrA lub GyrB z wybranymi substytucjami.



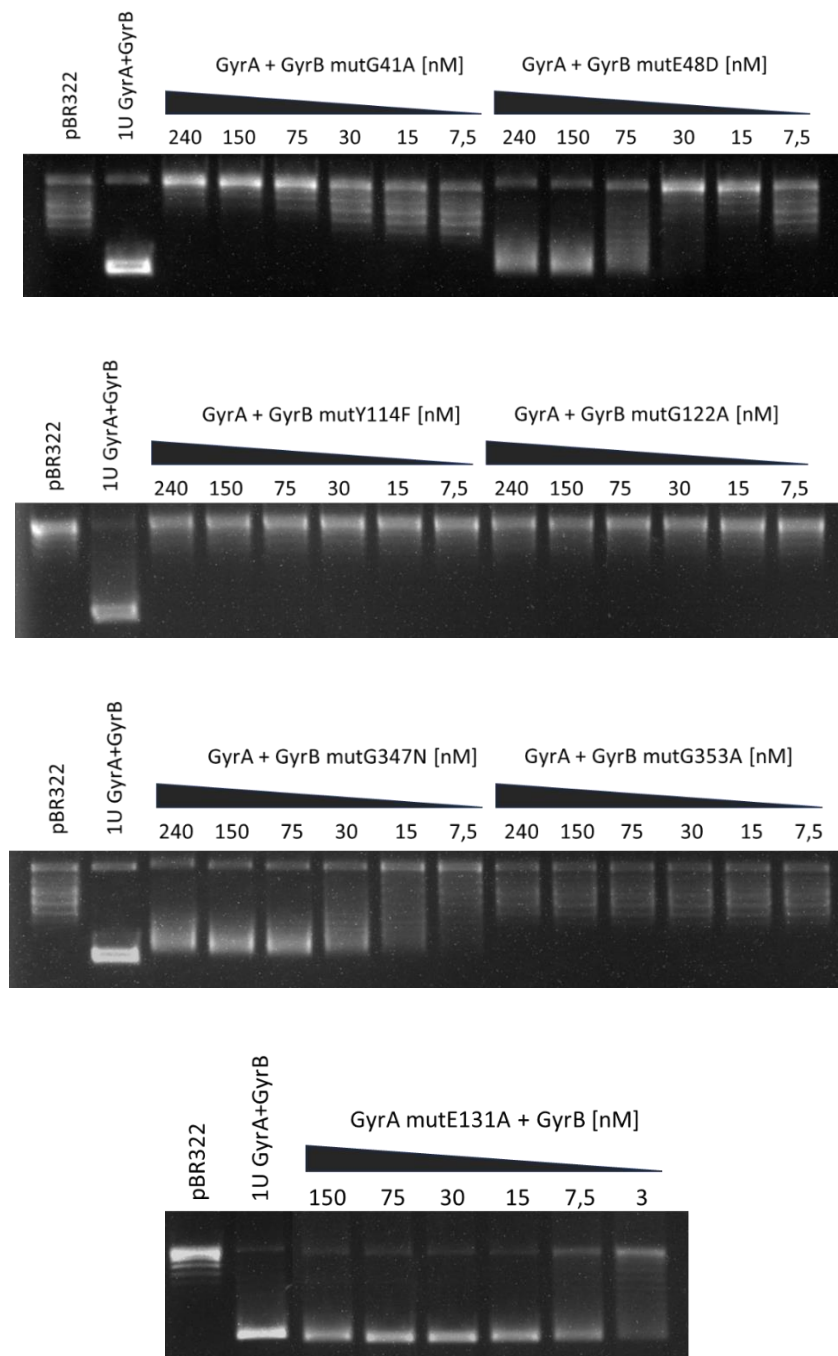
Rycina 4.31 Krzywe denaturacji termicznej białek GyrA oraz GyrB z substytucjami w konserwatywnych kodonach z kontrolą – odpowiednim białkiem bez mutacji. Panel A - wykres zależności stosunku absorpcji 350/330 nm (Ratio) od temperatury. Panel B - wskazuje na zmętnienie próbki (Turbidity), a panel C - średnicę hydrodynamiczną cząstek przez rozproszenie światła (Cumulant Radius) wraz ze wzrostem temperatury.

Dla białka GyrA temperatura topnienia wynosiła około 60°C, a dla białek GyrB utrata struktury trzeciorzędowej następowała w zakresie temperaturowym 40-50°C (Ryc 4.31 A). Wykresy zmętnienia (Turbidity, panel B) oraz promienia cząsteczek (Cumulant radius, panel C) wskazują na powstawanie agregatów po denaturacji białka. W przypadku wariantu GyrB mutG353A białko wykazywało mniejszą stabilność i szybszą agregację niż wariant natywny (Ryc 4.31 B, C). Pozostałe białka z substytucją w konserwatywnych kodonach GyrA mutE131A oraz GyrB mutG41A, mutE48D, mutY114F, mutG122A i mutG347N charakteryzowały się podobnymi właściwościami do wariantów natywnych bez substytucji.

#### **4.4.2.3 Ocena zdolności rekombinowanych białek z mutacjami w kodonach pod doborem oczyszczającym do superskręcania DNA**

W pierwszej kolejności oceniono czy substytucje w konserwatywnych kodonach powodowały utratę aktywności białka. W tym celu przeprowadzono test *in vitro* oceniający zdolność białek rekombinowanych do wprowadzania superskrętów w plazmidowym DNA pBR322 (Ryc. 4.32).

W przypadku białek z substytucjami w kodonie 41, 114, 122 oraz 353 w GyrB zaobserwowano całkowity brak aktywności enzymu, podczas gdy dla substytucji w kodonach 48 i 347 GyrB obserwowano częściową aktywność rekombinowanych białek, jednak nawet użycie wysokich stężeń białek uniemożliwiało całkowite superskręcenie plazmidu. Z kolei, pomimo obecności substytucji w konserwatywnym kodonie 131 w GyrA, białko zachowało pełną aktywność, a stężenie odpowiadające jednej jednostce aktywności było takie same jak dla wariantu natywnego białka – 7,5 nM.

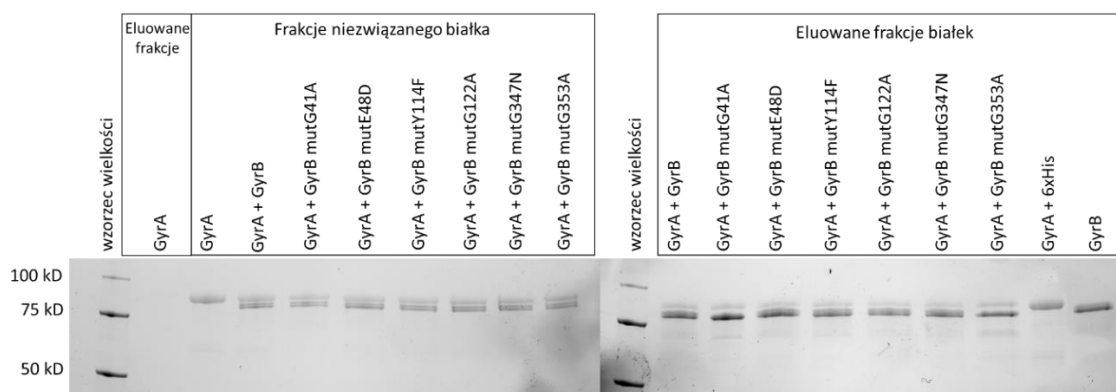


Rycina 4.32 Ocena aktywności białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB wybranymi jako miejsca konserwatywne w teście superskręcania zrelaksowanego pBR322, na podstawie różnic w migracji form topologicznych plazmidowego DNA w żelu agarozowym.

#### 4.4.2.4 Ocena tworzenia kompleksów gyrazy DNA

Brak aktywności rekombinowanych białek z substytucjami w miejscach konserwatywnych GyrB, wykazany w teście superskręcania DNA, może być

spowodowany ograniczeniem do tworzenia kompleksu składającego się z dwóch podjednostek GyrA oraz dwóch podjednostek GyrB. Z tego względu przeprowadzono test interakcji pomiędzy białkami w celu oceny tworzenia kompleksów enzymu. Do przeprowadzenia testu wykorzystano białko GyrA pozbawione metki histydynowej za pomocą proteazy TEV oraz białka GyrB z substytucjami w miejscach konserwatywnych posiadające na N-końcu sześć histydyń oraz złożo agarozowe wysycone jonami niklu (Ryc. 4.33). Obecność obu białek po związaniu i elucji ze złoża identyfikowano przez rozdział elektroforetyczny w żelu SDS-PAGE.



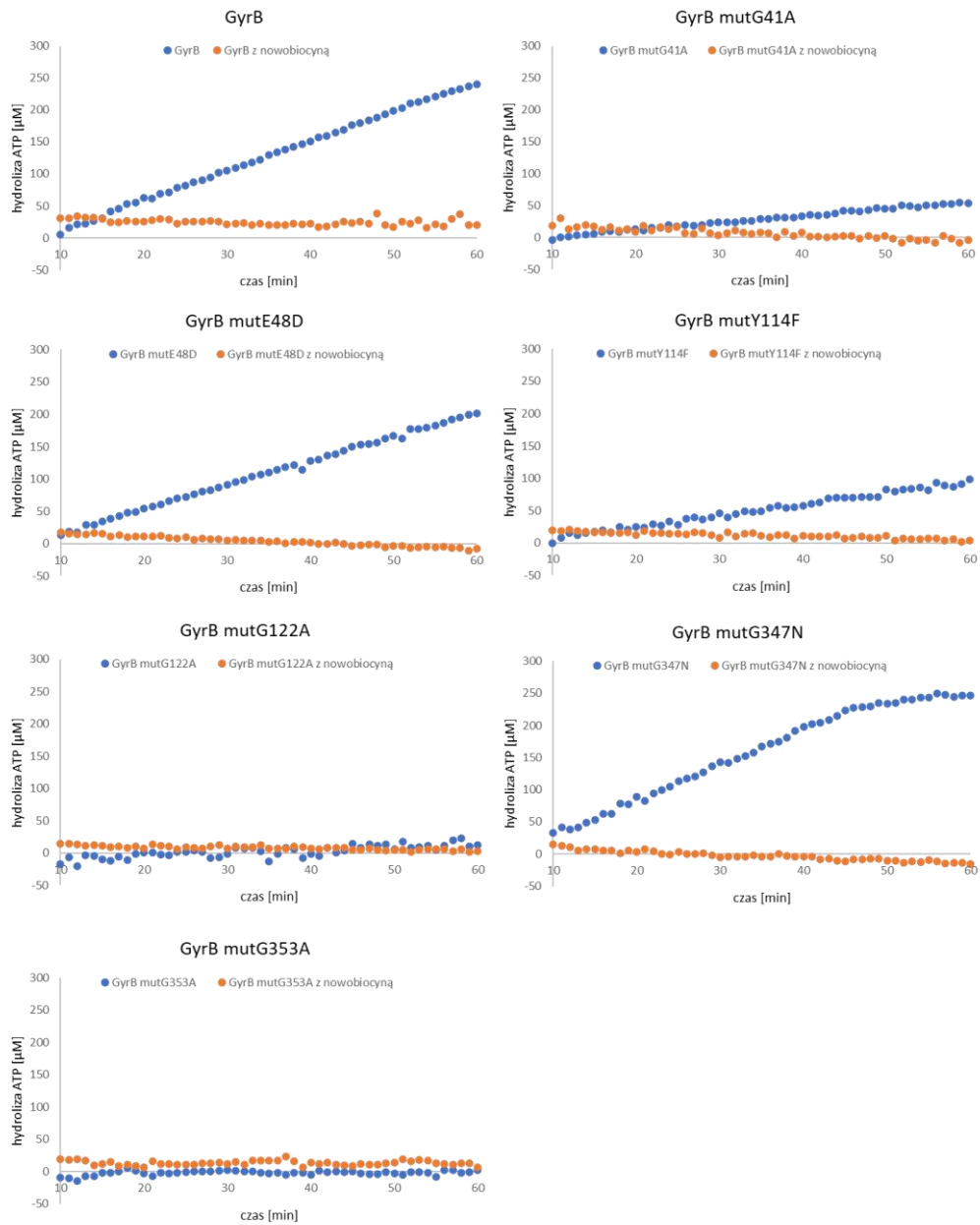
Rycina 4.33 Ocena tworzenia kompleksów gyrazy w teście pull-down. Na rycinie przedstawiono frakcje niezwiązanego ze złożem białka oraz frakcje białka po elucji ze złoża.

W przypadku wszystkich sześciu mutantów z substytucjami w kodonach konserwatywnych GyrB potwierdzono zdolność do tworzenia kompleksów GyrA-GyrB.

#### 4.4.2.5 Ocena zdolności do hydrolizy ATP

Z uwagi na fakt, że konserwatywne kodony 41, 48, 114, 122, 347 i 353 w GyrB znajdują się w domenie ATPazowej białka, postanowiono przeprowadzić test hydrolizy ATP, dzięki czemu możliwa była ocena wpływu substytucji w GyrB na zdolność do hydrolizy cząsteczki ATP. Wykonano sprzężony test enzymatyczny z wykorzystaniem ATP/NADH (ang. ATP/NADH coupled assay), a aktywność rekombinowanych białek oceniano na podstawie różnic w absorbancji, przy długości fali 340 nm, silnie absorbowanej przez NADH. W celu potwierdzenia, że zmiana absorbancji jest wywołana wyłącznie aktywnością GyrB lub kompleksu enzymu wykorzystano nowobiocynę, która jest inhibitorem gyrazy DNA. Nowobiocyna przyłącza się do GyrB w miejscu wiązania

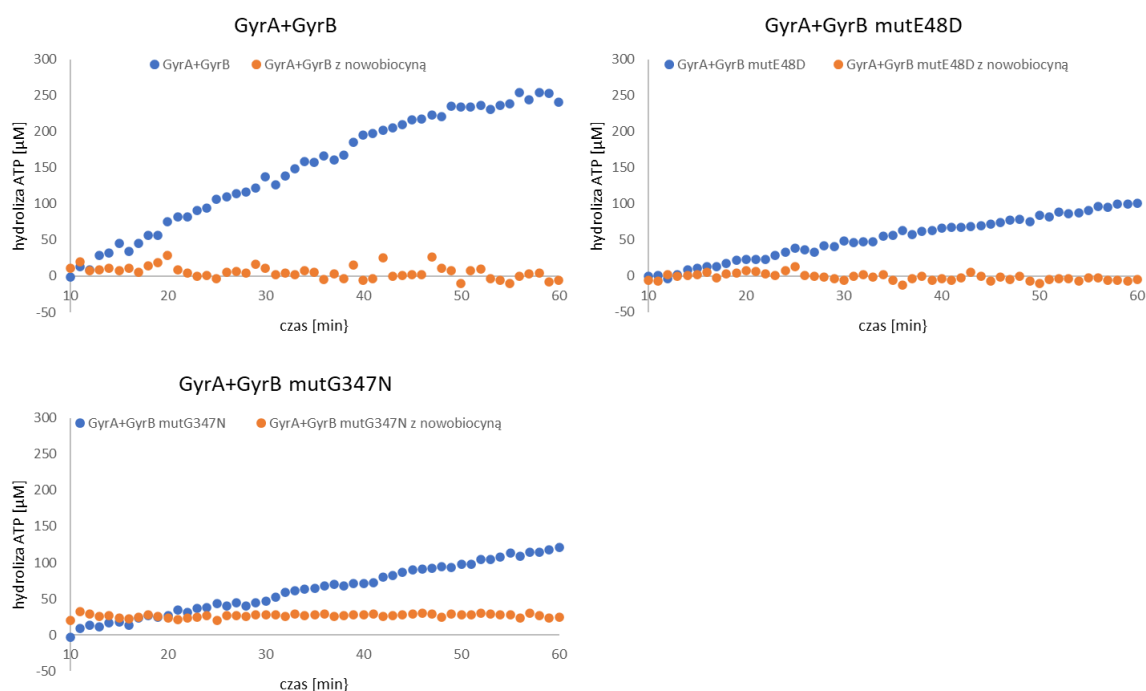
ATP i uniemożliwia hydrolizę tej cząsteczki. Oceniono zdolność do hydrolizy ATP przez GyrB w teście niezależnym od DNA (Ryc 4.34).



Rycina 4.34 Poziom hydrolizy cząsteczki ATP przez białka GyrB z substytucjami w konserwatywnych kodonach w sprzężonym teście enzymatycznym ATP/NADH w czasie. Na niebiesko zaznaczono reakcję w obecności białka GyrB, a na pomarańczowo białka z inhibitorem – nowobiocyną.

W przypadku wariantów z substytucjami mutG122A oraz mutG353A GyrB zaobserwowano całkowity brak zdolności do hydrolizy ATP. Dla wariantów G41A oraz Y114F GyrB odnotowano zahamowanie hydrolizy, której poziom był znacznie niższy niż

dla wariantu natywnego. Białka GyrB z substytucjami mutE48D oraz mutG347N były w pełni aktywne. Z tego względu dla aktywnych białek zdecydowano o przeprowadzeniu testu hydrolizy ATP przez kompleks GyrA<sub>2</sub>B<sub>2</sub> w obecności DNA (Ryc. 4.35).

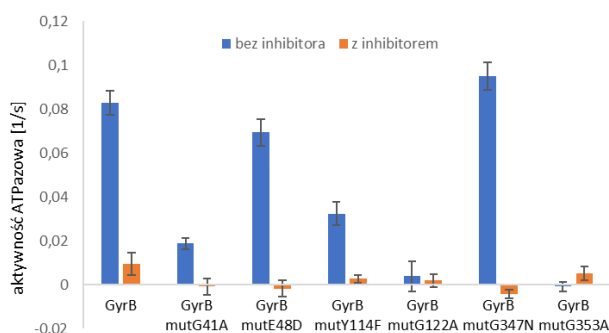


Rycina 4.35 Poziom hydrolizy cząsteczki ATP przez gyrazę DNA z substytucjami w konserwatywnych kodonach GyrB w obecności DNA w sprzężonym teście enzymatycznym ATP/NADH w czasie. Na niebiesko zaznaczono reakcję w obecności enzymu, a na pomarańczowo białka z inhibitorem – nowobiocyną.

Po przeprowadzeniu testu, w którym wykorzystano kompleks gyrazy i DNA, substytucje GyrB mutE48D oraz mutG347N spowodowały obniżenie zdolności do hydrolizy ATP w stosunku do gyrazy natywnej (Ryc. 4.35).

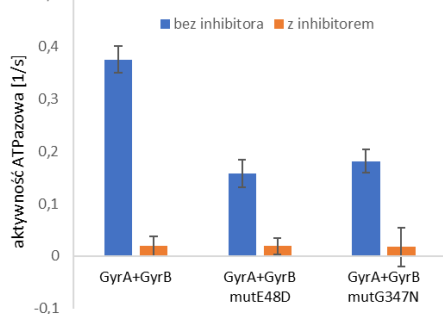
Ponadto oceniono aktywność białek rekombinowanych poprzez pomiar katalitycznej szybkości obrotu enzymu, czyli liczby cząsteczek substratu (ATP) przekształcanej przez jedną cząsteczkę gyrazy w ciągu jednej sekundy. Stałą katalityczną wyznaczono pomiędzy 45, a 60 minutą testu (Ryc. 4.36).

A



białko	aktywność ATPazowa [1/s]	
	bez inhibitora	z inhibitorem
GyrB	0,082844	0,009388
GyrB mutG41A	0,018797	-0,00095
GyrB mutE48D	0,069353	-0,0019
GyrB mutY114F	0,032366	0,002599
GyrB mutG122A	0,003775	0,001883
GyrB mutG347N	0,095094	-0,00438
GyrB mutG353A	-0,00084	0,005176

B



białko	aktywność ATPazowa [1/s]	
	bez inhibitora	z inhibitorem
GyrA+GyrB	0,375371	0,00431
GyrA+GyrB mutE48D	0,138101	-0,00652
GyrA+GyrB mutG347N	0,16479	0,045382

Rycina 4.36 Poziom aktywności ATPazowej A) GyrB z substytucjami i B) kompleksów gyrazy z substytucjami w konserwatywnych kodonach GyrB (niebieski) oraz poziom aktywności w obecności inhibitora – nowobiocyny (pomarańczowy) wyznaczony pomiędzy 45-60 minutą testu hydrolizy ATP.

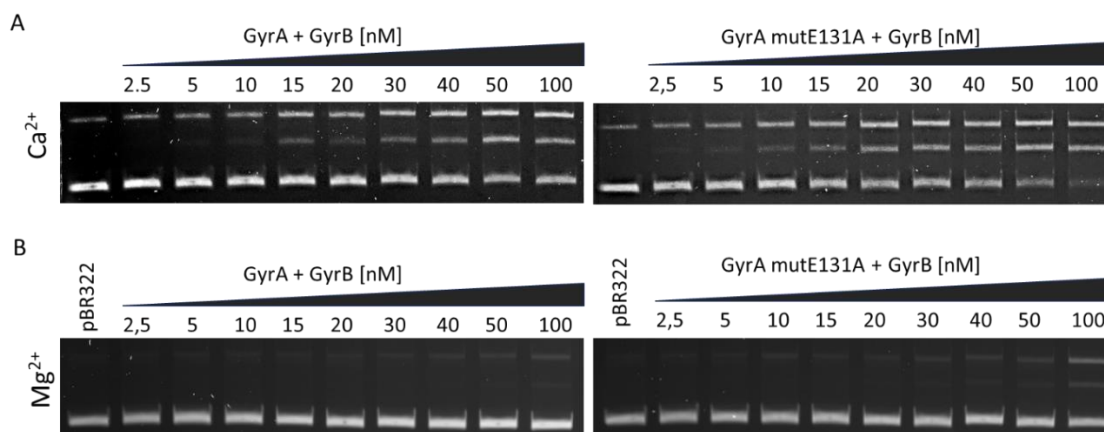
W przypadku testu z wykorzystaniem podjednostki B największy spadek aktywności w stosunku do białka natywnego obserwowano dla GyrB mutG122A (do 4,5%) oraz GyrB mutG353A (do 1%). Aktywność ATPazowa była na podobnym poziomie do aktywności GyrB dla mutE48D (83%) oraz mutG347N (115%). Podczas analizy kompleksów GyrA + GyrB odnotowano ponad dwukrotny spadek aktywności gyrazy spowodowany substytucjami mutE48D i mutG347N w GyrB, odpowiednio (42% i 48% aktywności kompleksu GyrA + GyrB bez substytucji).

#### 4.4.2.6 Aktywność enzymatyczna GyrA z substytucją E131A

Z uwagi na zaobserwowaną aktywność wariantu GyrA mutE131A (białko z substytucją w miejscu konserwatywnym) w teście superskręcenia pBR322, na poziomie jak dla białka natywnego postanowiono skonstruować szczep *M. tuberculosis* ze zwiększoną ekspresją genu *gyrA* z mutacją E131A. W tym celu przygotowano plazmid

integracyjny pMV306-KmR z wklonowanym genem *gyrA* z mutacją E131A pod promotorem *hsp60*. Zwiększenie ekspresji *gyrA* z tą mutacją nie pozwoliło na otrzymanie szczepu *M. tuberculosis*.

W kolejnym teście *in vitro* oceniającym poziom cięcia DNA przez gyrazę zaobserwowano zwiększoną aktywność enzymu z mutacją E131A w GyrA (Ryc. 4.37).



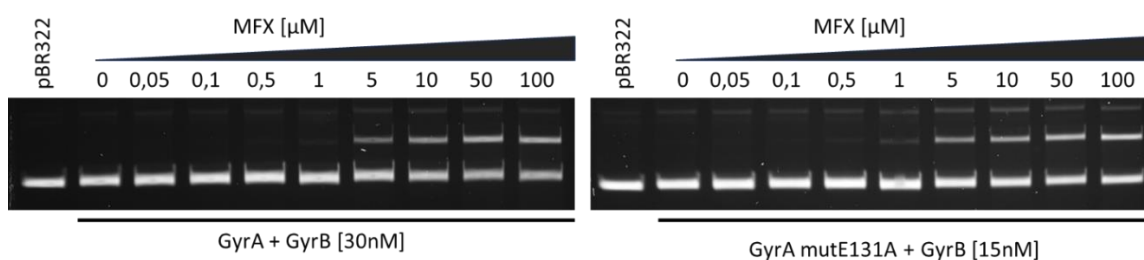
Rycina 4.37 Ocena aktywności rekombinowanego białka GyrA mutE131A w teście cięcia superskręconego DNA plazmidowego pBR322 w obecności A) jonów wapnia i B) jonów magnezu.

W obecności jonów wapnia około 10% aktywności enzymu zaobserwowano przy 30 nM białka natywnego i 15 nM białka z mutacją E131A, natomiast w obecności jonów magnezu maksymalna aktywność wariantu natywnego, wyniosła około 2%, przy stężeniu 100 nM; podczas gdy podobną aktywność GyrA mutE131A obserwowano przy 50 nM. Oszacowano, że enzym z mutacją posiadał około dwukrotnie większą aktywność do wprowadzania dwuniciowych pęknięć w DNA, bez zdolności do ponownego łączenia końców przeciętego DNA (Tab. 4.21). Ocenę przeprowadzono na podstawie pomiarów densytometrycznych przez stosunek formy liniowej do całkowitej zawartości DNA w reakcji dla trzech niezależnych powtórzeń.

Tabela 4.21 Ocena aktywności białka GyrA mutE131A w teście cięcia DNA na podstawie pomiaru densytometrycznego stosunku formy liniowej do całkowitej zawartości plazmidowego DNA w żelu agarozowym.

białko	warunki	stężenie	% aktywności ± SD
GyrA + GyrB	Obecność jonów wapnia	30 nM	10 ± 1,4
GyrA mutE131A + GyrB		15 nM	9 ± 1,3
GyrA + GyrB	Obecność jonów magnezu	100 nM	1,8 ± 0,2
GyrA mutE131A + GyrB		50 nM	1,9 ± 0,7

Dodatkowo sprawdzono wpływ mutacji na aktywność gyrazy w obecności moksyfloksacyny (Ryc. 4.38). Analizę przeprowadzono w taki sam sposób jak dla wariantów białek z substytucjami w kodonach pod dobozem różnicującym.



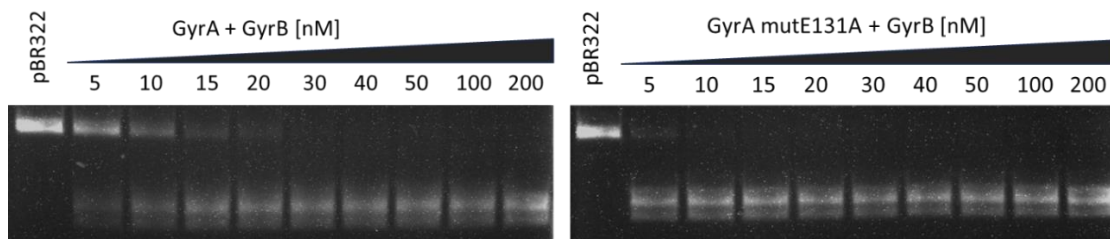
Rycina 4.38 Ocena wpływu moksyfloksacyny na aktywność rekombinowanego białka GyrA mutE131A w teście cięcia superskręconego DNA plazmidowego pBR322.

W teście z inhibitorem zaobserwowano brak znaczącego wpływu substytucji E131A w GyrA na oporność lub wrażliwość na moksyfloksacynę (Tab. 4.22)

Tabela 4.22 Ocena wpływu moksyfloksacyny na aktywność białka GyrA mutE131A w teście cięcia DNA na podstawie pomiaru densytometrycznego stosunku formy liniowej do całkowitej zawartości plazmidowego DNA w żelu agarozowym.

białko	Stężenie białka	CC <sub>50</sub> [μM]	Maksymalna obserwowana aktywność [%]	Maksymalna aktywność przy stężeniu MFX [μM]
GyrA + GyrB	30 nM	4.8	33,6 ± 2.8	100
GyrA mutE131A + GyrB	15 nM	4.1	26,4 ± 0.9	100

Ponadto sprawdzono wpływ obecności substytucji na zdolność do dekatencji DNA w teście *in vitro*. Zaobserwowano trzykrotne zwiększenie aktywności zmutowanego wariantu w stosunku do natywnego enzymu (Ryc. 4.39).



Rycina 4.39 Ocena aktywności białka GyrA mutE131A w teście dekatencji 1 µg substratu DNA (pBR322).

Jedną jednostkę aktywności, czyli zdolność do dekatencji minimum 95% substratu ustalono przy 10 nM dla wariantu z substytucją mutE131A i 30 nM dla natywnego białka (Tab. 4.23).

Tabela 4.23 Stężenia białka natywnego oraz GyrA mutE131A odpowiadające jednej jednostce aktywności enzymu w teście dekatencji DNA.

białko	jedna jednostka aktywności 1 U [nM]
GyrA + GyrB	30
GyrA E131A + GyrB	10

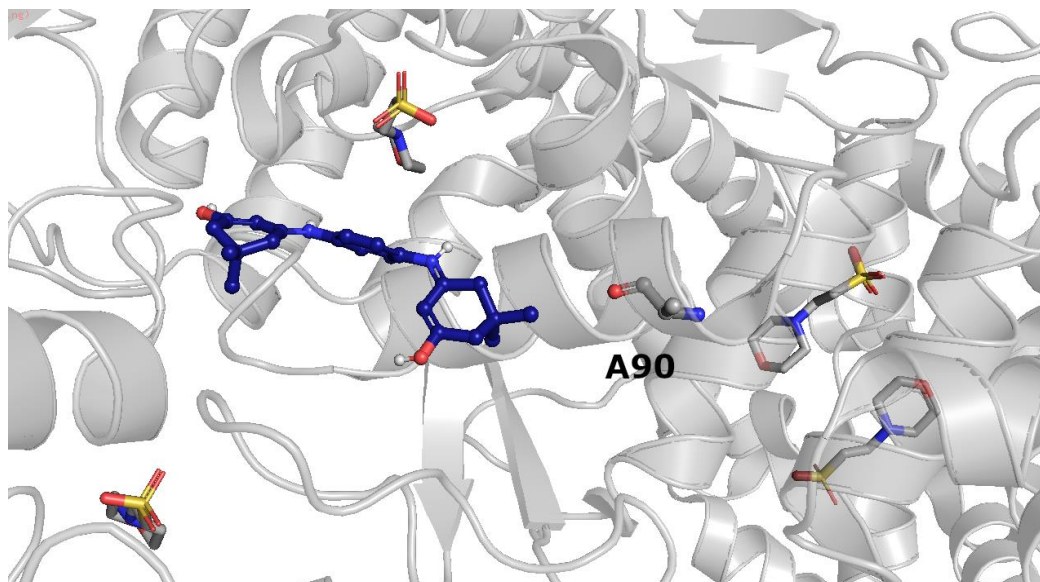
Ze względu na zaobserwowaną zwiększoną aktywność gyrazy z substytucją E131A w GyrA, podjęto próbę otrzymania szczepu *M. tuberculosis* ze zmniejszoną ekspresją genu *gyrA* z mutacją E131A. Umieszczenie genu *gyrA* pod promotorem genu *metE*, którego ekspresja jest zależna od obecności kobalaminy<sup>105</sup>, umożliwiło wykorzystanie witaminy B<sub>12</sub> w celu zmniejszenia ekspresji genu *gyrA*. Plazmid pMV306-KmR z wklonowanym genem *gyrA* pod kontrolą promotora *metE* wprowadzono metodą elektroporacji do komórek kompetentnych  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  *M. tuberculosis*. Transformaty wysiewano na podłoża hodowlane 7H10/OADC z dodatkiem różnych stężeń witaminy B<sub>12</sub>: 0,5; 5 oraz 10 µg/ml. Obecność mutacji sprawdzono przez amplifikację odpowiedniego fragmentu genu i sekwencjonowanie metodą Sangera. Pomimo kilku prób nie udało się otrzymać szczepu *M. tuberculosis* ze zmniejszoną ekspresją *gyrA* z mutacją E131A.

## 4.5 Identyfikacja nowych, potencjalnych inhibitorów gyrazy

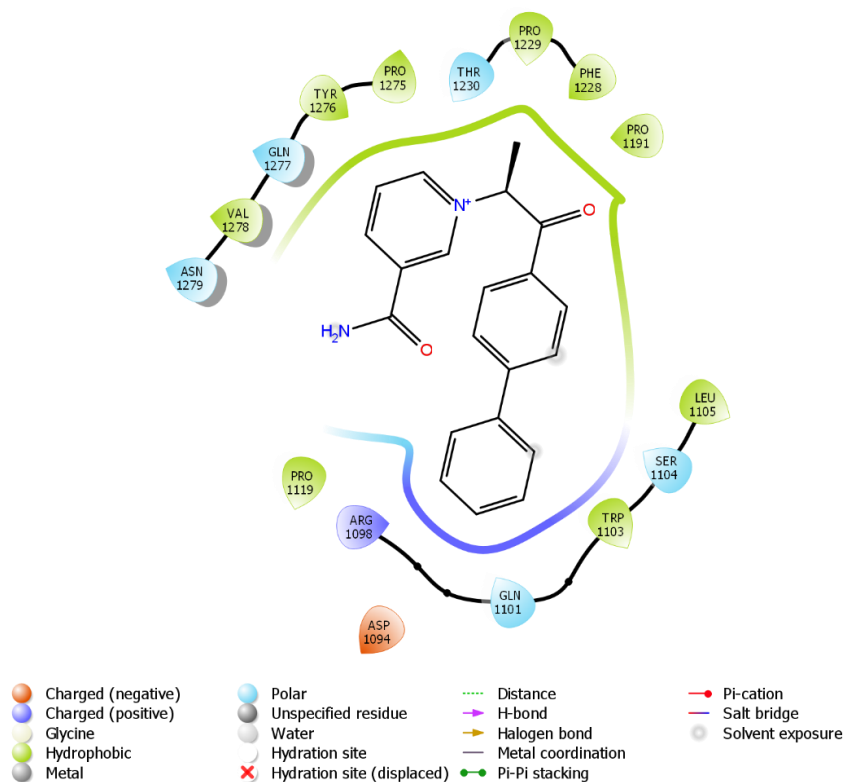
### 4.5.1 Wybór związków

Do identyfikacji nowych, potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA *M. tuberculosis* wykorzystano dwie metody: dokowanie molekularne przeprowadzone we współpracy z Zakładem Chemii Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk w Krakowie oraz poprzez wytrenowanie modelu sztucznej inteligencji we współpracy z Laboratorium Modelowania Molekularnego Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk.

Podczas poszukiwania związków skutecznych wobec szczepów *M. tuberculosis* opornych względem fluorochinolonów, wykorzystano dokowanie związków obecnych w bazie ChemBridge do kryształów białka numer 6GAV oraz 5BTA z bazy PDB oraz skonstruowanych modeli kryształów gyrazy DNA *M. tuberculosis* z wprowadzonymi substytucjami A90V i D94G w GyrA warunkującymi lekooporność (Ryc. 4.40, Ryc. 4.41). Na podstawie tej metody zidentyfikowano 165 związków z czego możliwy był zakup 74 z nich (Suplement Tab. S1, S2).



Rycina 4.40 Schemat dokowania molekularnego



Rycina 4.41 Diagram oddziaływań gyrazy DNA ze związkiem ZINC04714730 w postaci 2D.

W kolejnym etapie, w celu poszukiwania związków mogących wiązać się do miejsc konserwatywnych (kodony 41, 48, 114, 122, 347 oraz 353 w GyrB) wykorzystano dokowanie molekularne związków z bazy BindingDB do miejsc 347 oraz 353 podjednostki GyrB gyrazy DNA na kryształach 3ZKD oraz 6GAV z bazy PDB, gdzie zidentyfikowano 104 związki. Ponadto dokowanie związków z bazy ChEMBL pozwoliło na zidentyfikowanie 50 związków skierowanych na kieszeń ATPazową gyrazy. Dodatkowo na podstawie danych literaturowych wybrano 13 związków będących inhibitorami podjednostki B bakteryjnej gyrazy DNA (Suplement Tab. S3). Spośród zidentyfikowanych związków możliwy był zakup 88 inhibitorów wiążących się do kodonu 347 oraz 353 GyrB oraz jednego związku wybranego na podstawie przeglądu literaturowego.

Na podstawie wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji, czyli podobieństwa strukturalnego do obecnie znanych inhibitorów gyrazy zidentyfikowano 32 potencjalne związki z czego możliwy był zakup ośmiu z nich (numery 1-8) (Suplement Tab. S4).

#### 4.5.2 Weryfikacja działania potencjalnych inhibitorów gyrazy w teście MABA

W celu weryfikacji związków będących potencjalnymi inhibitorami gyrazy DNA oceniono ich aktywność względem szczepów *M. tuberculosis* wykorzystując metodę mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym i wskaźnika Alamar Blue (MABA). Dla związków wybranych w dokowaniu molekularnym z wykorzystaniem modeli kryształów z lekoopornymi substytucjami oceniono poziom wrażliwości szczepów: *M. tuberculosis* H37Rv,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  A90V i  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  D94G. W pierwszym etapie wytypowano związki, które hamowały wzrost bakterii przy stężeniu 30  $\mu\text{g/ml}$ , a następnie wykorzystując geometryczny szereg rozcieńczeń ustalono dokładne wartości MIC (Tab 4.24).

Tabela 4.24 Wartości MIC związków wybranych przez dokowanie molekularne do kryształów gyrazy i lekoopornych wariantów białka wyznaczone w teście MABA względem szczepów *M. tuberculosis* H37Rv,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  A90V i  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  D94G.

nr związku	masa molowa [g/mol]	MIC $\mu\text{g/ml}$	MIC $\mu\text{M}$
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv			
1-2B	430,98	15,2	35,4
1-5A	409,47	4,2	10,2
1-6F	431,54	3,8	8,8
1-7D	353,47	8,4	23,7
1-7E	355,45	7,6	21,4
1-10C	485,53	18,3	37,6
1-12B	444,57	18,3	41,2
2-10B	366,43	7,6	20,8
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ A90V			
1-2B	430,98	15,2	35,4
1-5A	409,47	> 30	> 73,3
1-6F	431,54	> 30	> 69,5
1-7D	353,47	> 30	> 84,9
1-7E	355,45	> 30	> 84,4
1-10C	485,53	18,3	37,6
1-12B	444,57	18,3	41,2
2-10B	366,43	> 30	> 81,9

$\Delta gyrA/attB::gyrA$ D94G			
1-2B	430,98	15,2	35,4
1-5A	409,47	> 30	> 73,3
1-6F	431,54	> 30	> 69,5
1-7D	353,47	> 30	> 84,9
1-7E	355,45	> 30	> 84,4
1-10C	485,53	18,3	37,6
1-12B	444,57	18,3	41,2
2-10B	366,43	> 30	> 81,9

Dla szczepu *M. tuberculosis* zidentyfikowano osiem związków, dla których wartości MIC wyniosły poniżej 20 µg/ml, a dla szczepów z mutacjami warunkującymi lekooporność trzy takie związki. Związkami charakteryzującymi się najwyższą aktywnością względem szczepu *M. tuberculosis* są związki 1-5A oraz 1-6F, dla których ustalono wartości MIC odpowiednio w stężeniu 4,2 µg/ml i 3,8 µg/ml. Dla testowanych fluorochinolonów wartości MIC dla szczepu referencyjnego wyniosły poniżej 0,5 µg/ml. W przypadku trzech związków: 1-2B, 1-10C, 1-12B, skutecznych względem szczepów opornych na działanie fluorochinolonów, wartości MIC wynosiły około 20 µg/ml i nie różniły się pomiędzy szczepem dzikim, a lekoopornymi.

W przypadku związków wybranych na podstawie poszukiwania inhibitorów wiążących się do miejsc konserwatywnych zidentyfikowano sześć związków o wartościach MIC mniejszych lub równych 30 µg/ml względem szczepów kontrolnych *M. tuberculosis*,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  oraz z mutacjami wykazującymi wzrost oporności względem fluorochinolonów:  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  A90V,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  D94G,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  E501D (Tab. 4.25).

Tabela 4.25 Wartości MIC związków wybranych przez dokowanie molekularne do miejsc konserwatywnych gyrazy DNA i na podstawie przeglądu literaturowego, wyznaczone w teście MABA, względem szczepów *M. tuberculosis* H37Rv,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$ ,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ ,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  A90V,  $\Delta gyrA/attB::gyrA$  D94G,  $\Delta gyrB/attB::gyrB$  E501D.

numer związku	masa molowa [g/mol]	MIC $\mu\text{g/ml}$	MIC $\mu\text{M}$
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	15	36,5
1-G01	814,1	7,5	9,2
1-G03	691,8	15	21,7
1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68
$\Delta gyrA/attB::gyrA$			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	30	73
1-G01	814,1	7,5	9,2
1-G03	691,8	30	43,4
1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68
$\Delta gyrB/attB::gyrB$			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	15	36,5
1-G01	814,1	3,75	4,6
1-G03	691,8	30	43,4
1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68
$\Delta gyrA/attB::gyrA$ A90V			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	15	36,5
1-G01	814,1	7,5	9,2
1-G03	691,8	30	43,4

1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68
<i>ΔgyrA/attB::gyrA D94G</i>			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	15	36,5
1-G01	814,1	7,5	9,2
1-G03	691,8	30	43,4
1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68
<i>ΔgyrB/attB::gyrB E501D</i>			
1-A07	163,3	3,75	23
1-D09	410,6	15	36,5
1-G01	814,1	3,75	4,6
1-G03	691,8	30	43,4
1-G04	787,9	30	38,1
2-B03	441,3	30	68

Dla związków 1-A07 oraz 1-G01 wartości MIC wynosiły poniżej 10 µg/ml i były na takim samym poziomie dla szczepów opornych względem fluorochinolonów, jak dla szczepów kontrolnych.

Dla związków wyselekcjonowanych na podstawie wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji ustalenie wartości MIC było możliwe dla czterech z ośmiu związków ze względu na ich wytrącenie w podłożu hodowlanym (Tab. 4.26).

Tabela 4.26 Wartości MIC związków wybranych z wykorzystaniem sztucznej inteligencji w teście MABA względem szczepu *M. tuberculosis* H37Rv. Związki wytrącające się w podłożu hodowlanym oznaczono ↓.

numer związku	Masa molowa [g/mol]	MIC (µg/ml)	MIC (µM)
1	420,5	15	35,7
2	398,5	↓	↓
3	394,5	↓	↓
4	424,5	↓	↓

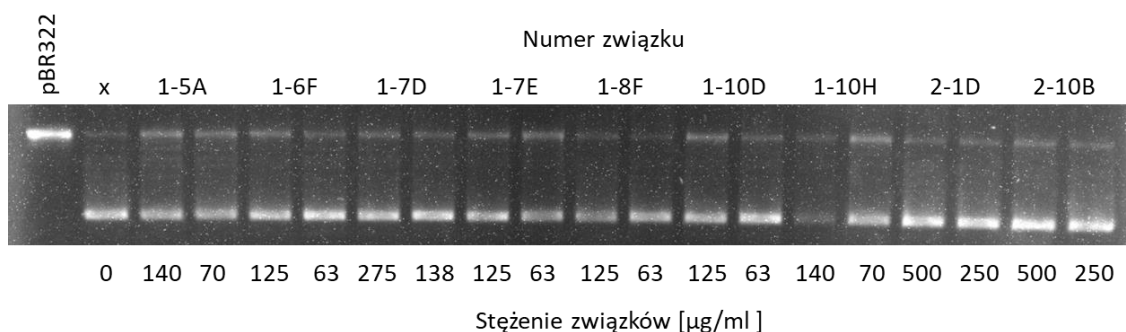
5	408,5	120	293,7
6	569,6	30	52,7
7	428,5	↓	↓
8	382,5	120	313,7

Otrzymane wartości MIC dla trzech związków były wysokie (powyżej 50  $\mu\text{M}$ ), a dla jednego ze związków (nr 1), charakteryzujących się najwyższą skutecznością względem szczepu *M. tuberculosis* z tego zbioru związków, wartość MIC wynosiła 15  $\mu\text{g/ml}$  (35,7  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.5.3 Weryfikacja działania potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA w testach *in vitro*

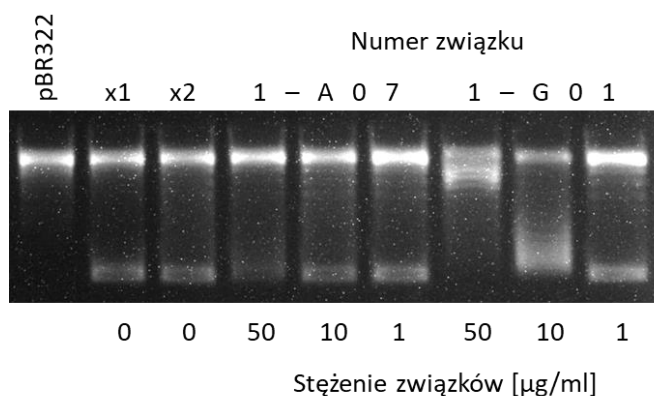
Kolejne badania, zmierzające do bezpośredniego sprawdzenia czy celem działania związków jest gyraza DNA, przeprowadzono test aktywności gyrazy (zdolności do wprowadzania superskrętów w zrelaksowanym DNA plazmidowym), dla wyselekcjonowanych związków charakteryzujących się zdolnością do zahamowania wzrostu szczepów *M. tuberculosis* (Wyniki 4.5.2).

Dla związków wybranych na podstawie dokowania do kryształów gyrazy natywnej oraz modeli z lekoopornymi substytucjami do testów *in vitro* wybrano związki, których wartości MIC w teście MABA wyniosły poniżej 10  $\mu\text{g/ml}$  (związki 1-5A, 1-6F, 1-7D, 1-7E, 2-10B). Ponadto w charakterze kontroli zastosowano cztery związki (1-8F, 1-10D, 1-10H, 2-1) wytypowane na podstawie dokowania molekularnego jako potencjalne inhibitory białka RpoB – podjednostki beta polimerazy RNA *M. tuberculosis* o wartości MIC poniżej 10  $\mu\text{g/ml}$ , wyznaczonej w teście MABA. Ze względu na możliwość zastosowania 1% DMSO w mieszaninie reakcyjnej w teście zastosowano najwyższe możliwe stężenie związku oraz stężenie odpowiadające połowie tej wartości. Wybrane stężenia różniły się pomiędzy związkami ze względu na różne stężenia początkowe inhibitorów wykorzystanych w teście. Dla badanych związków w wybranych stężeniach nie zaobserwowano zahamowania aktywności gyrazy (Ryc. 4.42).



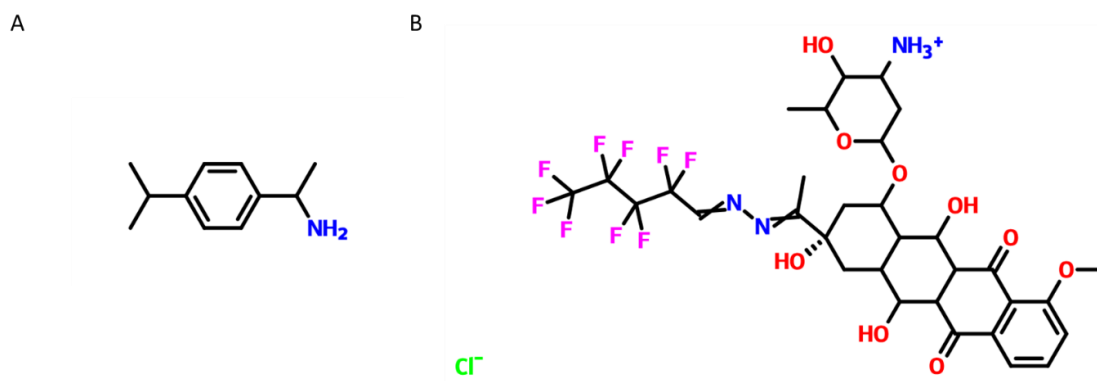
Rycina 4.42 Ocena aktywności gyrazy DNA w obecności badanych związków wybranych na podstawie dokowania molekularnego. Związki 1-5A, 1-6F, 1-7D, 1-7E, 2-10B wybrane jako potencjalne inhibitory gyrazy oraz związki 1-8F, 1-10D, 1-10H, 2-1D wybrane jako potencjalne inhibitory RpoB podczas dokowania molekularnego. x - kontrola pozytywna bez inhibitora.

W przypadku związków, wiążących się podczas dokowania molekularnego do wybranych miejsc konserwatywnych, będących inhibitorami gyrazy, do testów *in vitro* wytypowano związki 1-A07 oraz 1-G01, których wartości MIC w teście MABA wynosiły poniżej 10 µg/ml. Dodatkowo zastosowano wyższe stężenia związków, jednocześnie zwiększając zawartość DMSO w mieszaninie reakcyjnej do 5%. Takie samo stężenie DMSO zastosowano w próbie kontrolnej bez inhibitora (Ryc. 4.43).

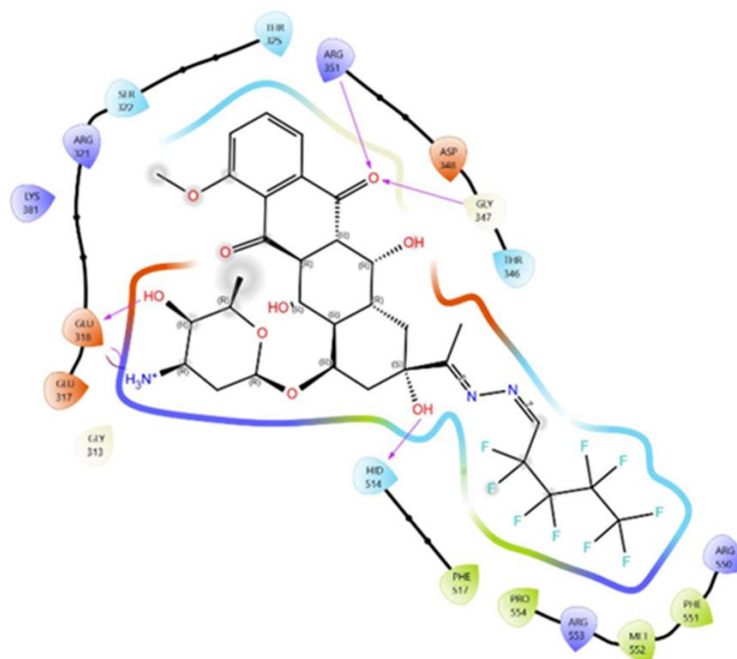


Rycina 4.43 Ocena aktywności gyrazy DNA w teście superskręcania zrelaksowanego DNA pBR322 w obecności badanych związków (1-A07, 1-G01) wybranych na podstawie dokowania molekularnego do wybranych miejsc konserwatywnych. Jako x1 oznaczono kontrolę pozytywną bez inhibitora w obecności 1% DMSO, a x2 w obecności 5% DMSO. W przypadku związku 1-A07 przy stężeniu 50 µg/ml zaobserwowano zahamowanie aktywności gyrazy DNA, związek 1-G01 hamował aktywność enzymu w stężeniu 10 µg/ml.

Inhibitor A-107 należy do grupy amin alifatycznych, z kolei 1-G01 jest fluorowaną pochodną antracyklin (Ryc. 4.44). Związki te w dokowaniu molekularnym wiązały się do kodonów 347 oraz 353 GyrB (Ryc. 4.45), a test *in vitro* potwierdził ich zdolność do hamowania aktywności gyrazy DNA *M. tuberculosis*.



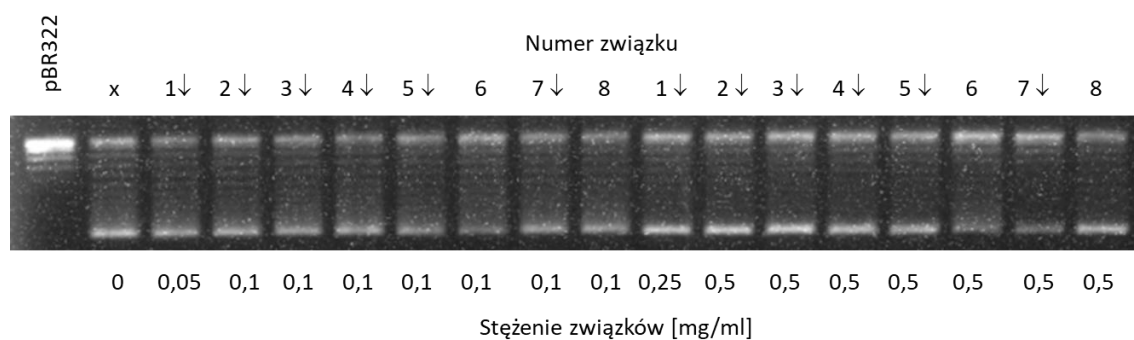
Rycina 4.44 Wzory strukturalne związków A) 1-A07 oraz B) 1-G01, opracowane z wykorzystaniem strony mcule.com<sup>106</sup>.



Rycina 4.45 Diagram interakcji ligand-białko związku numer 1-G01 z GyrB.

Związek 1-G01 wchodzi w kontakt z resztą G347 tworząc silne i stabilne wiązanie wodorowe. Częsteczką jest dobrze zakotwiczona w kieszeni wiążącej dzięki dalszym licznym wiązaniom wodorowym, w tym z R351 oraz E318, przy czym ta ostatnia również tworzy mostek solny, dodatkowo stabilizując konformację liganda.

Również dla związków wybranych z wykorzystaniem sztucznej inteligencji przeprowadzono test aktywności gyrazy w obecności ośmiu inhibitorów przy stężeniu 0,05 i 0,25 mg/ml dla związku numer jeden oraz 0,1 i 0,5 mg/ml dla pozostałych związków 2-8 (Ryc. 4.46).



Rycina 4.46 Ocena aktywności gyrazy DNA w obecności badanych związków (1-8) wybranych z wykorzystaniem wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji. Jako x oznaczono kontrolę pozytywną bez inhibitora w obecności 1% DMSO, a oznaczenie ↓ wskazuje na wytrącanie związku w mieszaninie reakcyjnej.

Pomimo zastosowania wysokich stężeń zaobserwowano brak ich wpływu na aktywność gyazy DNA. Dodatkowo związki numer 1, 2, 3, 4, 5 oraz 7 wykazywały różny stopień wytrącania po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej (Ryc. 4.45).

## 5. Dyskusja

Fluorochinolony są kluczową grupą antybiotyków o szerokim spektrum działania z powodzeniem wykorzystywaną w schematach leczenia wielolekoopornej gruźlicy. W trakcie realizacji pracy doktorskiej skupiono się na identyfikowaniu pozycji aminokwasowych warunkujących oporność prątków na fluorochinolony, pozycji konserwatywnych, stanowiących potencjalne miejsca nowych, skutecznych inhibitorów gyrazy DNA oraz poszukiwaniu nowych, potencjalnych inhibitorów gyrazy. Do identyfikacji ww. pozycji aminokwasowych wykorzystano wzorcowanie ewolucyjne, polegające na wykrywaniu zmienności sekwencji genów *gyrA* oraz *gyrB* w populacji bakterii należących do gatunku *M. tuberculosis*, rodzaju *Mycobacterium* oraz typu *Actinobacteria*. Po zdefiniowaniu, na podstawie analiz *in silico*, potencjalnych miejsc związanych z występowaniem lekooporności (kodony pod doбором różnicującym) oraz potencjalnych miejsc konserwatywnych (kodony pod doбором oczyszczającym) stanowiących atrakcyjne miejsca wiązania dla nowych leków przeciwgruźliczych, przystąpiono do eksperymentalnej weryfikacji znaczenia substytucji w wytypowanych kodonach na funkcjonowanie szczepów *M. tuberculosis* oraz na aktywność rekombinowanych białek gyrazy DNA.

Opisane w niniejszej pracy analizy miały na celu identyfikację nowych substytucji aminokwasowych w genach gyrazy DNA, które wpływają na wzrost oporności na fluorochinolony. Na podstawie analiz *in silico* z wykorzystaniem wzorcowania ewolucyjnego, wytypowano pięć kodonów, w których mutacje mogą być spowodowane występowaniem presji selekcyjnej wywołanej przez chemioterapeutyki stosowane w leczeniu gruźlicy, a co za tym idzie mogą powodować pojawianie się oporności. Wybrane mutacje wprowadzono do genomu szczepów *M. tuberculosis* w oparciu o skonstruowane modele genetyczne ( $\Delta gyrA/attB::gyrA$  oraz  $\Delta gyrB/attB::gyrB$ ) w celu oceny wpływu mutacji na funkcjonowanie prątka gruźlicy w jednolitym tle genetycznym. Przeprowadzone badania pozwoliły na potwierdzenie związku znanych mutacji A90V, D94G w *gyrA* oraz E501D, S447F w *gyrB* z generowaniem oporności na fluorochinolony poprzez wzrost wartości MIC szczepów i wyznaczenie poziomu lekooporności dla poszczególnych wariantów. Co istotne zidentyfikowane w niniejszych badaniach mutacje D94C w *gyrA* oraz R446C/H/L i S447Y w *gyrB*, również warunkowały wzrost oporności na szereg fluorochinolonów w teście MABA.

Otrzymane wyniki wskazują na skuteczność zaproponowanego modelu genetycznego do oceny poziomu lekooporności dla poszczególnych mutacji w identycznym tle genetycznym. Stanowi to istotną wartość pracy, ponieważ zwykle badania poziomu lekooporności oparte są o szczepy kliniczne, u których poziom lekooporności warunkowany jest przez szereg oddziaływań epistatycznych, utrudniając określenie realnego wpływu mutacji na wywoływanie lekooporności<sup>87</sup>. Jest to szczególnie istotne dla substytucji wywołujących niski poziom lekooporności.

W poprzednich badaniach Malik i współpracowników dotyczących poziomu lekooporności wywoływanych przez poszczególne mutacje w gyracie, zastosowano mutanty uzyskane w wyniku transdukcji, a mutacje wprowadzano bezpośrednio w genach natywnych<sup>107</sup>. W modelu zaproponowanym w niniejszej pracy geny natywne usunięto, a mutacje wprowadzano w genach umieszczonych uprzednio w miejsce *attB*. Tego typu rozwiązanie pozwoliło na usprawnienie i przyspieszenie procesu uzyskiwania mutantów *M. tuberculosis*. Ograniczono w ten sposób długotrwały proces uzyskiwania mutantów z wykorzystaniem rekombinacji homologicznej, a mutagenezę oparto o bardziej wydajną rekombinację miejscowo-specyficzną w miejscu *attB*<sup>100, 108</sup>.

Uzyskane wyniki dotyczące poziomu lekooporności dla znanych wariantów wskazują na skuteczność zastosowanego modelu. W niniejszej pracy doktorskiej wartości MIC uzyskane w teście MABA dla moksyflokscyny dla szczepów z wariantami genów typu dzikiego były na poziomie 0,0625 µg/ml, a dla mutantów A90V i D94G, odpowiednio 0,5 µg/ml i 1 µg/ml (8x i 16x wyższe). Takie samo stopniowanie zaobserwowano dla ofloksacyny, gdzie wartości wyniosły 0,5 µg/ml, 4 µg/ml i 8 µg/ml odpowiednio dla szczepu dzikiego, mutantu A90V i mutantu D94G. W innych badaniach naukowcy wykorzystywali odmienne metody do oceny lekooporności, ale poziom zmian pod wpływem mutacji pozostał zbliżony. Malik i współpracownicy w swoich badaniach wykorzystywali metodę proporcji do oceny poziomu MIC w mutantach *M. tuberculosis* uzyskanych w wyniku transdukcji otrzymując takie same wartości MIC dla ofloksacyny szczepów z mutacjami A90V i D94G jak w naszych badaniach<sup>107</sup>. W badaniach Sirgela i współpracowników, gdzie ocenę wrażliwości klinicznych szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego systemu BACTEC MGIT 960, szczepy wrażliwe wykazywały poziom lekooporności na ofloksacynę w zakresie 0,5 – 2 µg/ml, natomiast szczepy noszące mutacje A90V 2-6 µg/ml, a D94G 6-≥10 µg/ml. Dla moksyflokscyny

dla szczepów z mutacją A90V wartości MIC wyniosły 0,25-1 µg/ml, a D94G 1-2 µg/ml<sup>109</sup>.

Co istotne, zastosowany przez nas model okazał się skuteczny do wykrycia lekooporności wywoływanej mutacjami borderline. Mutacje borderline to mutacje wywołujące niewielki wzrost oporności na fluorochinolony, charakteryzujące się wartościami MIC zbliżonymi do aktualnie założonego punktu odcięcia. Tego typu mutacje często stanowią problem w diagnostyce, ponieważ wywołują one niezgodność pomiędzy fenotypową i genotypową oceną lekooporności. Choć Europejski Komitet ds. Oznaczania Wrażliwości na Leki Przeciwdrobnoustrojowe nie wyznaczył jeszcze oficjalnie wartości krytycznych dla metody mikrorozcieńczeń w bulionie dla *M. tuberculosis*, aktualnie stosowany punkt krytyczny dla moksyflokscyny z wykorzystaniem płytek Sensititre firmy Thermo Fisher Scientific to 1 µg/ml<sup>110</sup>. W naszych wynikach, podczas badania mutantów w Laboratorium Referencyjnym Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, substytucje na pozycjach R446C/H/L i S447Y wykazywały poziom lekooporności na poziomie 0,5 µg/ml.

Szczepy z mutacją R446C (jeden wśród 87 szczepów klinicznych z Tanzanii oraz 9 wśród 15211 szczepów klinicznych z 23 krajów), R446H, R446L oraz S447Y w *gyrB* (odpowiednio trzy, dwa i trzy szczepy wśród 15211 przypadków klinicznych) były wcześniej identyfikowane jako odporne względem fluorochinolonów<sup>111,112</sup>. Kodony 446 oraz 447 *gyrB* położone są daleko od miejsca wiązania fluorochinolonów, dlatego sugeruje się, że mutacje w tych miejscach mogą wpływać na zmiany allosteryczne białka i położenie innych reszt aminokwasowych, a w szczególności kodonów D461 i R482 *GyrB*, które tworzą kieszeń wiążącą fluorochinolony<sup>112</sup>. Za oporność szczepów prątki gruźlicy na fluorochinolony odpowiadają w około 90% mutacje w kodonie 90 i 94 *gyrA*. Zidentyfikowana mutacja D94C w *gyrA* znajduje się w kodonie, w którym mutacje prowadzą do zmiany kształtu kieszeni wiążącej fluorochinolony, przez co zmniejsza się ich zdolność wiązania do kompleksu gyrazy z DNA<sup>113</sup>. Mutacja była wcześniej raportowana u jednego z 138 szczepów z 2007 roku w Chinach opornych na ofloksacynę<sup>114</sup>.

Prawidłowa diagnostyka jest kluczowym elementem w kontroli zakażeń prątkiem gruźlicy. Umożliwia wdrożenie odpowiedniego leczenia, co z kolei zwiększa szanse pacjentów, jak również zapobiega rozprzestrzenianiu się lekoopornych szczepów

i pojawianiu się wybuchów epidemiologicznych. Złotym standardem diagnostyki gruźlicy są metody mikrobiologiczne, opierające się na bakterioskopii i hodowli prątków na pożywkach, co jednak jest czasochłonne. Dużym usprawnieniem stało się wprowadzenie w 2010 roku zautomatyzowanych, molekularnych testów amplifikacji kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification test, NAAT) Xpert MTB/RIF umożliwiających ocenę obecności prątków i ich oporności na ryfampicynę. Testy te obecnie są zalecane przez WHO do przeprowadzenia wstępnej diagnostyki gruźlicy, niemniej jednak posiadają też pewne ograniczenia - są przeznaczone wyłącznie do wykrywania DNA prątka oraz oceny określonej liczby mutacji warunkujących oporność wyłącznie na ryfampicynę. Zatem brak jest możliwości oceny postępów leczenia jak i wznowy zachorowania, a dodatkowo wymagają one dostępności odpowiedniej aparatury. Testy te mogą również prowadzić do otrzymania fałszywych wyników (czułość i swoistość testów Xpert MTB/RIF na poziomie odpowiednio 0,85 i 0,98, natomiast wariant Ultra testu charakteryzuje się wyższą czułością równą 0,9)<sup>115,116</sup>. Testy Xpert TB/XDR umożliwiają ocenę oporności na izoniazyd, etionamid, amikacynę, kanamycynę, kapreomycynę czy fluorochinolony, ale ograniczają się tylko do najczęściej występujących mutacji. Szacuje się, że w przypadku szczepów opornych na fluorochinolony, jedynie dla około 20% zostało wykonane badanie w kierunku oceny ich wrażliwości na te leki przed wdrożeniem procesu leczenia. Choć testy molekularne przyczyniają się do znacznego usprawnienia diagnostyki lekoopornej gruźlicy, to w przypadku fluorochinolonów, oporność jest identyfikowana jedynie na podstawie mutacji w kodonach 87-95 *gyrA* i 531-544 *gyrB*<sup>115</sup>. Natomiast w przypadku innych, nowszych antybiotyków jak linezolid czy bedakilina oporność nadal jest określana za pomocą testów fenotypowych<sup>115</sup>. Wśród testów NAAT można wyróżnić również komercyjne testy LPA (ang. line probe assay) oparte o PCR i hybrydyzację z sondami DNA umieszczonymi na membranie, które w przeciwieństwie do testów Xpert nie wymagają posiadania zaawansowanej aparatury<sup>115</sup>. Nowym standardem diagnostyki molekularnej staje się sekwencjonowanie całogenomowe (ang. whole-genome sequencing, WGS) lub ukierunkowane sekwencjonowanie następnej generacji (ang. targeted next-generation sequencing, tNGS). Choć wciąż w większości krajów tNGS/WGS nie jest rutynowo stosowane w diagnostyce gruźlicy, to dostarcza istotnych informacji na temat lekooporności szczepów jak również umożliwia śledzenie transmisji prątka gruźlicy i nadzór epidemiologiczny<sup>117,118</sup>. Analiza wyników sekwencjonowania pozwala na przewidywanie oporności badanych szczepów w stosunku do większości

stosowanych w leczeniu gruźlicy chemioterapeutyków, natomiast ocena ta opiera się na wiedzy dotyczącej zależności pomiędzy występowaniem mutacji w określonych genach, a opornością<sup>87</sup>. Istotnym ograniczeniem diagnostyki z wykorzystaniem WGS lub tNGS jest również wysoki koszt analizy oraz konieczność, w przypadku standardowego WGS, uzyskania hodowli prątka gruźlicy. Metoda tNGS może być natomiast wykorzystywana bezpośrednio z materiału klinicznego (np. plwociny)<sup>118,119</sup>.

Diagnostyka lekooporności z wykorzystaniem metod genetycznych opiera się na znajomości mutacji warunkujących oporność na wybrane związki. W celu uniknięcia zaklasyfikowania lekoopornego szczepu jako wrażliwego na fluorochinolony należy określić znaczenie wszystkich mutacji pojawiających się w gyrazie DNA klinicznych szczepów prątków gruźlicy. Obecnie katalog WHO wskazuje na substytucje aminokwasowe w genach gyrazy, które odpowiadają za pojawianie się oporności na moksyflokscynę i lewoflokscynę, ale znaczna część przedstawionych mutacji jest o nieznanym znaczeniu (760 substytucji aminokwasowych)<sup>87</sup>. Nasze badania stanowią uzupełnienie dla katalogu WHO, wskazując na związek pomiędzy mutacjami w kodonach R446C/H/L i S447Y, a pojawianiem się lekooporności i wpisują się w strategię WHO End TB, usprawniając ocenę poziomu lekooporności w oparciu o metody genotypowe<sup>120</sup>.

Analizy *in vitro* wariantów białek noszących badane substytucje aminokwasowe pozwoliły lepiej poznać mechanizmy nabywania oporności na fluorochinolony. Większość rekombinowanych białek zachowała podobny poziom aktywności, zdolności do superskręcania zrelaksowanego DNA plazmidowego, do natywnego enzymu. Jedynie wariant R446L charakteryzował się mniejszą aktywnością, natomiast analiza z wykorzystaniem PrometheusPanta wskazywała na mniejszą stabilność zmutowanego wariantu białka, co może być spowodowane obecnością badanej mutacji lub problemami technicznymi z uzyskaniem stabilnych preparatów tego białka. W obecności moksyflokscyny znane mutacje związane z opornością, jak również nowo zidentyfikowane D94C w GyrA i S447Y w GyrB, powodowały zwiększenie wartości IC<sub>50</sub> w teście superskręcania DNA (dla znanych mutacji A90V, D94G w GyrA, S447F, E501D w GyrB 1,6-9x wzrost oraz 8,5x dla GyrA mutD94C i 1,7x dla GyrB mutS447Y). W badaniach Aubry i współpracowników również zaobserwowano wzrost wartości IC<sub>50</sub> dla moksyflokscyny dla białek z substytucjami A90V i D94G w GyrA, odpowiednio 17,5 i 25x, co odpowiada niskiemu i wysokiemu poziomowi oporności warunkowanemu

tymi mutacjami<sup>121</sup>. Podobną tendencję zaobserwowano w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy, choć różnice w wartościach IC<sub>50</sub> były mniejsze w stosunku do wariantu natywnego. Dla mutacji w kodonie 446 GyrB, które powodowały wzrost minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii *M. tuberculosis* w obecności fluorochinolonów, na poziomie enzymu nie zaobserwowano znaczącego wpływu substytucji na aktywność superskręcania DNA przez białka, co ma prawdopodobnie związek z mniejszą czułością testów *in vitro*. Co za tym idzie wzrost wartości MIC powodowany mutacjami w kodonie 446 mógł być niewystarczający do zaobserwowania wpływu substytucji na aktywność białek.

Mykobakteryjna gyraza DNA charakteryzuje się podobną aktywnością superskręcania jak u innych bakterii, natomiast posiada większą zdolność do relaksacji, rozszczepiania łańcuchów DNA i dekatencji<sup>122</sup>, a za wybór rodzaju aktywności enzymu prawdopodobnie odpowiada jon wapnia<sup>123</sup>. W teście cięcia DNA wartość CC<sub>50</sub> moksyflokscyny dla natywnego wariantu gyrazy wyniosła 4,8 μM. Podobne wyniki otrzymano przez Aubry i współpracowników, gdzie dla 2U gyrazy wartość CC<sub>50</sub> była równa około 10 μM<sup>124</sup>. Inne badania wskazywały wartość CC<sub>25</sub> na poziomie 2,5-5 μM dla wariantu natywnego oraz 10 μM z substytucją D94G w GyrA<sup>121</sup>. Test rozszczepiania łańcucha DNA pozwala na identyfikację mechanizmu działania fluorochinolonów – gromadzenia dwuniciowych pęknięć przez co plazmidowy DNA widoczny jest w formie liniowej. Dla nowo zidentyfikowanych mutacji D94C w GyrA oraz S447Y w GyrB zaobserwowano wzrost wartości CC<sub>50</sub> w stosunku do białka bez substytucji. W przypadku wariantu z mutacją w kodonie 446 GyrB w teście cięcia DNA w obecności moksyflokscyny rekombinowane białko posiadało aktywność zbliżoną do natywnego.

Jedynie w teście dekatencji DNA wariant z substytucją R446H powodował wzrost wartości IC<sub>50</sub> moksyflokscyny, co potwierdza związek tej substytucji z występowaniem oporności i wzrost ten był wyższy niż w przypadku białek z substytucją w kodonie 447 GyrB. Natomiast test dekatencji wymagał użycia wyższych stężeń białek z mutacjami w kodonach 446 i 447 GyrB (1U = 50 - 100 nM) niż w przypadku enzymu natywnego (1U = 30 nM). W innych badaniach podczas dekatencji kDNA (kinetoplast) dla gyrazy DNA *M. tuberculosis* obserwowano aktywność nawet przy 10 nM, natomiast badany substrat był inny niż ten wykorzystany w niniejszej pracy<sup>48</sup>.

Co istotne w przypadku enzymów z substytucjami w kodonie 446 oraz 447 w GyrB obserwowano znacznie mniejszą zdolność białek do wprowadzania cięć w DNA bez ponownego łączenia. Poza wariantem GyrB R446L, pozostałe białka z substytucją w kodonach 446 i 447 wykazywały taki sam lub zbliżony do wariantu natywnego, poziom aktywności w teście superskręcania DNA. Wskazuje to, na brak wpływu substytucji w badanych kodonach na ogólną zdolność białka do wprowadzania negatywnych superskrętów, natomiast w teście rozszczepiania łańcucha DNA zaobserwowano znaczny wpływ mutacji na zmniejszenie zdolności do religacji DNA w obecności jonów wapnia. Może to wskazywać na odmienną koordynację jonu wapnia wariantów z mutacją, co jednak wymaga dalszej weryfikacji. Taka aktywność białka może sprzyjać występowaniu presji selekcyjnej i zmniejszaniu ilości dwuniciowych pęknięć DNA w komórce bakteryjnej, co z kolei może wyjaśniać obecność doboru różnicującego.

Przeprowadzone w toku niniejszej pracy badania wskazują na istotne znaczenie mutacji w kodonie 446, 447 oraz 565 w *gyrB* w nabywaniu oporności na związek z grupy NBTI – gepotidacynę. Natywny wariant białka w teście aktywności (superskręcania DNA plazmidowego) wykazywał porównywalny poziom  $IC_{50}$  dla gepotidacyny (2  $\mu M$ ) jak w badaniach przeprowadzonych przez Kokot i współpracowników (4  $\mu M$ )<sup>65</sup>. Natomiast obecność substytucji w wymienionych kodonach powodowała wyraźny wzrost (3-7x) wartości  $IC_{50}$ . Podobnie było w przypadku oceny wartości MIC dla gepotidacyny względem szczepów z mutacjami, gdzie również zaobserwowano zwiększenie oporności mutantów, szczególnie dla wariantów z mutacją w kodonie 447 *gyrB*.

Podsumowując część pracy doktorskiej dotyczącą doboru różnicującego, wyniki pozwoliły na identyfikację nowych mutacji: warunkujących oporność na fluorochinolony – D94C w *gyrA*, gepotidacynę – Q565H w *gyrB* oraz obie grupy związków – R446C/H/L i S447Y w *gyrB*. Jest to istotne z punktu widzenia diagnostyki klinicznej lekoopornych zakażeń jak i potencjalnego, przyszłego wdrożenia inhibitorów z grupy NBTI do leczenia gruźlicy. W toku realizacji pracy zidentyfikowano dodatkową substytucję D94C w *gyrA* związaną z lekoopornością na fluorochinolony, poza mutacjami D94A/N/G/H/Y wcześniej zdefiniowanymi przez WHO<sup>87</sup>. Ze względu na umiejscowienie kodonów 446, 447 oraz 565 *gyrB* z daleka od miejsca wiązania zarówno fluorochinolonów, jak i związków z grupy NBTI, mechanizm oporności najprawdopodobniej opiera się na wprowadzaniu zmian allosterycznych w strukturze białka i zmianie dotychczasowego miejsca wiązania leków<sup>112</sup>. Alternatywnie, zmniejszenie aktywności białek

z substytucjami w kodonach 446 i 447 GyrB w teście cięcia DNA w obecności jonów wapnia, może wskazywać na znaczenie mutacji w stabilizacji kompleksów enzym-DNA.

Drugim filarem niniejszej pracy doktorskiej było poszukiwanie konserwatywnych aminokwasów w białku, mogących stanowić potencjalnie najlepsze miejsce wiązania dla nowych leków przeciwpłatkowych. W celu identyfikacji miejsc konserwatywnych zastosowano wzorcowanie ewolucyjne<sup>93</sup>. Metoda ta nie jest pozbawiona mankamentów - spośród 32 miejsc wybranych na podstawie analiz bioinformatycznych, jako będących pod działaniem doboru oczyszczającego, po eksperymentalnej weryfikacji zidentyfikowano jedynie siedem takich miejsc (około 20%).

Wyznaczenie kodonów konserwatywnych jest znacznie trudniejsza niż tych charakteryzujących się wysoką zmiennością. Brak zmienności na danej pozycji nie zawsze świadczy o występowaniu doboru oczyszczającego, ale może być wynikiem braku zmienności wywołanej przez dryf genetyczny. Populacja *M. tuberculosis* znana jest z wysokiej homogenności szczepów<sup>125</sup>. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym w niniejszych badaniach jest zmienne dostosowanie szczepów do przeżywania w warunkach klinicznych i w warunkach laboratoryjnych. Analizy bioinformatyczne przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencji genomów klinicznych szczepów *M. tuberculosis* oraz bakterii środowiskowych, a wprowadzenie mutacji w szczepie laboratoryjnym mogło być możliwe ze względu na hodowlę w sztucznych warunkach, gdzie zmiana aminokwasu nie wpłynęła negatywnie na dostosowanie bakterii. Niemniej jednak określono siedem miejsc konserwatywnych z czego jedno znajdowało się w *gyrA* (E131), a sześć z nich znajdowało się w domenie ATPazowej podjednostki B gyrazy DNA. Białko noszące substytucję E131A zachowało aktywność do superskręcania DNA i wykazywało około dwukrotnie większą aktywność do wprowadzania dwuniciowych pęknięć w DNA. Uzyskanie mutantów *M. tuberculosis* ze zwiększoną lub zmniejszoną ekspresją białka okazało się niemożliwe. Kodon E131 znajduje się w pobliżu katalitycznej reszty tyrozynowej Y129 odpowiedzialnej za wiązanie DNA<sup>33</sup>. Substytucje aminokwasowe w tym miejscu mogą prowadzić do zwiększenia aktywności enzymu związanej z wprowadzaniem cięć DNA, co z kolei może być niekorzystne dla komórki bakteryjnej i prowadzić do toksycznego nagromadzenia dwuniciowych pęknięć. Uzyskane wyniki są niejednoznaczne w kontekście konserwatywności danej pozycji aminokwasowej.

Substytucje aminokwasowe w miejscach konserwatywnych GyrB prowadziły do zahamowania aktywności gyrazy DNA przez inhibicję hydrolizy ATP (G41, Y114, G122, G353) lub przekazania sygnału wewnątrz cząsteczki białka (E48, G347). Podczas symulacji dynamiki molekularnej gyrazy DNA *M. tuberculosis* Kamsri i współpracownicy opisali propagację sygnału w domenie ATPazowej. W trakcie analizy wykazali, że kodon G122 wraz z L120 uczestniczy w tworzeniu wiązania wodorowego pomiędzy białkiem, a ATP. Z kolei aminokwasy E48, Y114 oraz N52, D55, I84 i H121 tworzą kieszeń nukleotydową i zmieniają swoje położenie w zależności od obecności ATP<sup>45</sup>. Mutacja E48D w GyrB, nie spowodowała całkowitego zahamowania hydrolizy ATP, natomiast w niniejszej pracy przeprowadzono badania, w których wykorzystano substytucję aminokwasem z tej samej grupy, co spowodowało skrócenie łańcucha o jeden atom węgla. Prawdopodobnie utworzenie kieszeni dla cząsteczki ATP było możliwe, ale propagacja sygnału została utrudniona. Pozostałe kodony G347 oraz G353, które nie uczestniczą w bezpośredniej interakcji z ATP znajdują się w poddomenie transducer, która odpowiada za stabilizację dimeru GyrB oraz oddziaływania z GyrA, a tym samym wpływają na zmiany konformacyjne całego kompleksu w odpowiedzi na hydrolizę cząsteczki ATP<sup>45</sup>. Podczas testu hydrolizy ATP przeprowadzonego w niniejszej pracy, zaobserwowano, że rekombinowane białko GyrB z mutacją G353A, wykazywało całkowity brak zdolności do hydrolizy ATP, co jednak mogło wynikać z utrudnionego oczyszczania tego wariantu oraz zaburzonej struktury III-rzędowej (nanoDSF i DLS) wpływającej na jego stabilność. Na podstawie powyższych analiz można wnioskować, że substytucja G353A mogła zaburzyć prawidłowe fałdowanie cząsteczki białka, co mogło wpłynąć na całkowity brak aktywności białka. W przypadku wariantu GyrB mutG347N obserwowano zachowanie zdolności podjednostki B do hydrolizy cząsteczki ATP, natomiast aktywność całego kompleksu gyrazy DNA z tą substytucją była zmniejszona.

Podsumowując, w toku prowadzonych badań wskazano na dwie kieszenie białka GyrB w której zakotwiczone są aminokwasy konserwatywne (G41, E48, Y114, G122 oraz G347 i G353) i które mogą stanowić solidny punkt wiązania dla inhibitorów gyrazy. Wcześniejsze badania również wskazują na możliwość wykorzystania kieszeni ATPazowej dla inhibitorów gyrazy<sup>33,126</sup>. Badania symulacyjne i modelowanie molekularne pokazały, że nowobiocyna wiąże się do kieszeni ATPazowej, w tym do Y114 poprzez oddziaływania hydrofobowe i wiązania  $\pi$ <sup>126</sup>. Pomimo zdolności nowobiocyny do hamowania aktywności gyrazy, problemem jest jej niska aktywność

względem bakterii *M. tuberculosis*, prawdopodobnie ze względu na specyficzną budowę ściany komórkowej i niską przepuszczalność<sup>127</sup>.

W świetle rosnącej lekooporności szczepów *M. tuberculosis* na chemioterapeutyki stosowane w leczeniu, również na te nowo wprowadzone do terapii jak delamanid czy bedakilina, trzecim istotnym aspektem pracy było poszukiwanie nowych, skutecznych inhibitorów wzrostu prątków gruźlicy. Poszukiwania oparto na kilku podejściach: 1) dokowaniu molekularnym do dzikich i zmutowanych wariantów białek, 2) w oparciu o sztuczną inteligencję i 3) dokowaniu molekularnym do zidentyfikowanych kieszeni konserwatywnych białka.

W pierwszej kolejności za pomocą dokowania molekularnego zidentyfikowano inhibitory skuteczne wobec natywnej gyrazy DNA oraz wobec wariantów z mutacjami A90V i D94G w GyrA, warunkującymi oporność na działanie fluorochinolonów. Poszukiwano związków skutecznych względem lekoopornych szczepów. Dokowanie molekularne umożliwiło identyfikację pięciu związków o wysokiej aktywności względem szczepu referencyjnego prątka gruźlicy (MIC < 10 µg/ml) oraz trzech związków o takiej samej aktywności (10 µg/ml < MIC < 20 µg/ml) względem szczepu kontrolnego i szczepów z mutacjami warunkującymi lekooporność. Jednak nie zaobserwowano wpływu związków na aktywność gyrazy w enzymatycznym teście *in vitro*, co może wskazywać na inny niż gyraza cel molekularny tych związków w komórkach mykobakterii, brak inhibicyjnego działania na gyrazę w zastosowanych warunkach eksperymentu *in vitro*, konieczną obecność dodatkowych elementów (np. kofaktorów), których nie dostarczono w badaniach biochemicznych lub na aktywację związków w komórce do formy aktywnej przez niezidentyfikowany dotychczas enzym prątka. Wyjaśnienie rozbieżności pomiędzy testem fenotypowym, a testem *in vitro* wymaga identyfikacji i charakterystyki mutantów opornych na badane związki. Niemniej jednak, niezależnie od wyników dalszych badań, związki te są interesujące ze względu na silne działanie przeciwprątkowe również względem lekoopornych szczepów. Dalsze modyfikacje chemiczne czy synteza pochodnych tych związków może dodatkowo zwiększyć ich aktywność. Zidentyfikowane inhibitory o najwyższej aktywności względem referencyjnego szczepu prątka gruźlicy H37Rv, o wartości MIC < 5 µg/ml (1-5A, 1-6F) należą do grupy heteroaromatycznych związków triazynowych. Choć dla wybranych związków nie potwierdzono zdolności do hamowania aktywności gyrazy

DNA to badane są inhibitory tego enzymu, które w swojej strukturze posiadają triazyny<sup>128</sup>.

Innym podejściem było wytrenowanie modelu sztucznej inteligencji do poszukiwania związków na podstawie podobieństwa budowy strukturalnej do obecnie znanych inhibitorów. W badaniach wskazano potencjalne inhibitory, natomiast ich dostępność do badań była niska, a następnie trudności techniczne związane z ich wytrącaniem się w podłożu hodowlanym spowodowały niską wydajność zastosowanego podejścia. Nie udało się potwierdzić zdolności żadnego ze związków do hamowania aktywności gyrazy DNA. Tym niemniej, wyniki uzyskane dla wyselekcjonowanych związków mogą pozwolić na lepsze wytrenowanie modelu sztucznej inteligencji w przyszłości.

Najbardziej skutecznym podejściem do poszukiwania nowych inhibitorów w niniejszych badaniach okazało się zastosowanie wzorcowania ewolucyjnego. Przeprowadzone dokowanie molekularne do wybranych miejsc konserwatywnych pozwoliło na identyfikację dwóch związków 1-A07, 1-G01 (wiążących się do kodonów 347 i 353) skutecznych względem szczepów *M. tuberculosis* (przy wartości MIC < 8 µg/ml) o potwierdzonej zdolności do zahamowania aktywności gyrazy DNA w teście *in vitro*. Ponadto związki te były również skuteczne względem szczepów *M. tuberculosis* lekoopornych na fluorochinolony, co może wskazywać na ich odmienne miejsce wiązania niż w przypadku tej grupy związków. Pierwszy ze związków (1-A07) należy do aromatycznych amin alifatycznych natomiast drugi (1-G01) to fluorowana pochodna antracyklin – związków stosowanych w leczeniu nowotworów, których celem działania są topoizomerazy typu II. W poprzednich badaniach, antracyklina StafB wyizolowana ze *Streptomyces scabrisporus* była testowana w odniesieniu do aktywności wobec referencyjnego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv oraz opornego na ryfampicynę. Oceniono wartości MIC, które wyniosły odpowiednio 7,8 µg/ml i 3,9 µg/ml. Dodatkowo StafB wykazywała działanie przeciwpłatkowe przy stężeniu ponad sześciokrotnie niższym niż stężenie toksyczne dla linii komórek nabłonkowych Vero<sup>129</sup>. Inne badania, na podstawie dokowania molekularnego, zidentyfikowały doksorubicynę, epirubicynę i idarubicynę jako potencjalne inhibitory domeny ATPazowej gyrazy mykobakteryjnej, a za pomocą analizy spektroskopii fluorescencyjnej potwierdzono występowanie wiązania pomiędzy tymi antracyklinami i GyrB na poziomie Kd = 5,5-6,7 µM. Wykazano również zdolność związków do hamowania hydrolizy ATP przez GyrB, a najniższa wartość MIC względem szczepu prętka gruźlicy wyniosła 6,3 µM dla epirubicyny<sup>130</sup>. Związek o numerze CID

71966041, zidentyfikowany w niniejszej pracy (1-G01) na podstawie dokowania molekularnego do konserwatywnych miejsc gyrazy, może stanowić potencjalny inhibitor domeny ATPazowej gyrazy DNA, co jednak powinno zostać eksperymentalnie zweryfikowane, a dalsze modyfikacje mogą przyczynić się do zwiększenia aktywności i selektywności przeciwprątkowej.

W toku realizacji pracy doktorskiej po raz pierwszy zweryfikowano metodę wzorcowania ewolucyjnego poprzez eksperymentalną ocenę znaczenia mutacji gyrazy DNA *M. tuberculosis* w miejscach pod wpływem działania doboru oczyszczającego i różnicującego. Metoda wzorcowania ewolucyjnego została po raz pierwszy opisana przez Duranda i współpracowników w 2008 roku, ale jak dotąd nie została eksperymentalnie zweryfikowana. Jako model badawczy wybrano *Plasmodium falciparum*, gatunek protista odpowiedzialny za występowanie malarii, bazując na kinazie glicerolowej tego pasożyta, enzymu istotnego w biosyntezie fosfolipidów i metabolizmie węglowodanów. Na podstawie analiz bioinformatycznych zidentyfikowano kodony pod wpływem działania silnego doboru oczyszczającego. Walidację konserwatywności miejsc przeprowadzono na dwa sposoby: poprzez analizę innego regionu - reduktazy dihydrofolianowej-syntazy tymidylanowej (*dhfr-ts*) i kodonów, w których mutacje warunkują oporność na pirymetaminę. Na podstawie analiz *in silico* miejsca te były pod wpływem działania doboru różnicującego, słabego oczyszczającego lub o neutralnym znaczeniu. Drugie podejście polegało na wykorzystaniu kryształu białka, kinazy glicerowej *E. coli* do identyfikacji miejsc istotnych dla aktywności enzymu. Następnie określono, że miejsca te są pod wpływem działania silnego doboru oczyszczającego<sup>93</sup>. W obu przypadkach walidację przeprowadzono z wykorzystaniem metod bioinformatycznych. Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej stanowią kontynuację i rozszerzenie badań dotyczących wzorcowania ewolucyjnego. Wykazano, że badania oparte o wzorcowanie ewolucyjne wymagają eksperymentalnej weryfikacji i mogą stanowić podstawę do identyfikacji aminokwasów zaangażowanych w pojawianie się lekooporności oraz kieszeni konserwatywnych białka dla wiązania inhibitorów.

Prowadzone w toku niniejszej pracy doktorskiej badania noszą pewne ograniczenia. Pierwszą trudnością w pracy jest ocena fenotypu dostosowania prątków wzrastających na podłożach hodowlanych. Nie można wykluczyć, że wiele ze wstępnie zidentyfikowanych pozycji aminokwasowych wpływa na funkcjonowanie prątków i innych bakterii, ale

w założeniu, naturalna presja selekcyjna jest odmienna niż presja na podłożach hodowlanych<sup>131</sup>. Stąd ocena wzorcowania ewolucyjnego dla pozycji konserwatywnych może być zniekształcona. Drugą istotną niedogodnością pracy jest niemożność przebadania wszystkich pozycji z katalogu WHO o nieznanym znaczeniu w generowaniu lekooporności. Choć przebadanie większej ilości mutantów *M. tuberculosis* było niemożliwe ze względów czasowych i finansowych, automatyzacja procesu uzyskiwania plazmidów, a co za tym idzie usprawnienie procesu uzyskiwania mutantów *M. tuberculosis*, stanowi potencjalną dalszą ścieżkę badań z wykorzystaniem genetycznego modelu stworzonego w ramach niniejszej pracy. Model ten stanowi zatem wartościowe narzędzie, które może zostać ponownie wykorzystane zarówno do oceny lekooporności mutantów *M. tuberculosis*, jak i walidacji nowych inhibitorów. Ostatnim ważnym ograniczeniem jest ocena wzorcowania ewolucyjnego wyłącznie na podstawie gyrazy *M. tuberculosis*. Rozszerzenie badań o inne białka *M. tuberculosis* oraz o białka innych organizmów pozwoli na lepszą ocenę skuteczności zastosowania metody wzorcowania ewolucyjnego w badaniach naukowych.

Podsumowując, zastosowane podejście wzorcowania ewolucyjnego pozwoliło na rozszerzenie wiedzy dotyczącej znaczenia poszczególnych substytucji w generowaniu lekooporności u prątków gruźlicy i wskazało nowe, potencjalne inhibitory. Uzyskane wyniki mają przełożenie na usprawnienie procesu diagnostyki gruźlicy lekoopornej i stanowią punkt wyjścia dla dalszych badań nad rozwojem skuteczniejszych inhibitorów. Oba procesy wpisują się w strategię WHO End TB mającej na celu ochronę życia ludzkiego.

## 6. Wnioski

- ✓ Występowanie mutacji w kodonach 90, 94 w *gyrA* oraz 446, 447 w *gyrB* w genomach *M. tuberculosis* powinna klasyfikować szczep jako potencjalnie oporny na fluorochinolony.
- ✓ Mutacje w kodonach 446, 447, 565 *gyrB* warunkują oporność na gepotidacynę co jest istotna z punktu widzenia przyszłego wdrożenia inhibitorów z grupy NBTI do leczenia gruźlicy
- ✓ Obecność mutacji w kodonach 446 oraz 447 *gyrB* hamuje zdolność gyrazy do wprowadzania cięć bez ponownego łączenia w obecności jonów wapnia oraz do dekatencji DNA.
- ✓ Kodony 41, 48, 114, 122, 347, 353 *gyrB* oraz 131 *gyrA*, jako konserwatywne, stanowią dobre, potencjalnie miejsce wiązania dla nowych leków przeciwgruźliczych
- ✓ Związki 1-2B, 1-10C, 1-12B zidentyfikowane w badaniach *in silico* jako inhibitory gyrazy DNA zawierającej mutacje w kodonie 90 i 94 *gyrA*, wykazują działanie przeciwprątkowe w niskich stężeniach w stosunku do szczepu dzikiego, jak i mutantów *M. tuberculosis* opornych na fluorochinolony i powinny być poddane dalszym badaniom przedklinicznym.
- ✓ Wyselekcjonowane w badaniach *in silico* związki 1-A07 oraz 1-G01, zidentyfikowane jako wiążące się do kodonów konserwatywnych 347 i 353 *gyrB*, wykazują istotne działanie przeciwprątkowe oraz zdolność do hamowania aktywności gyrazy DNA. Z uwagi na powyższe, potencjalnie mogą zapobiegać gromadzeniu mutacji warunkujących oporność szczepów *M. tuberculosis* i powinny zostać poddane dalszym badaniom eksperymentalnym.

## 7. Streszczenie

*Mycobacterium tuberculosis* jest czynnikiem etiologicznym gruźlicy, która w 2024 roku była przyczyną śmierci 1,23 miliona osób, a z ciężkimi objawami choroby zmagало się około 10,7 milionów. Gruźlica wciąż pozostaje jedną z 10 głównych przyczyn zgonów na świecie (dane WHO na 2021 rok). Poważny problem stanowi rosnąca lekooporność szczepów, która znacznie utrudnia leczenie i zapobieganie rozprzestrzeniania się zakażeń. Jedną z istotnych grup leków stosowanych w leczeniu gruźlicy są fluorochinolony, których celem działania jest gyraza DNA, jedyna topoizomeraza typu II prątka gruźlicy.

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania analiz zmienności sekwencji genów *gyrA* i *gyrB* (wzorcowania ewolucyjnego), do optymalizacji chemoterapii gruźlicy przez poszukiwanie nowych, skutecznych inhibitorów gyrazy DNA oraz usprawnienia diagnostyki gruźlicy przez identyfikację mutacji związanych z występowaniem oporności. Podejście to umożliwiło otrzymanie danych mogących przyczynić się do ułatwienia walki z lekoopornością *M. tuberculosis*. Ponadto pozwoliło na eksperymentalną ocenę skuteczności metody wzorcowania ewolucyjnego i możliwości wykorzystania tego podejścia do analiz innych genów prątka gruźlicy, czy kolejnych patogenów.

W pierwszej kolejności na podstawie analiz *in silico* opartych o wzorcowanie ewolucyjne zidentyfikowano kodony gyrazy DNA będące pod działaniem doboru różnicującego (pięć kodonów), w których mutacje mogą być związane z pojawianiem się lekooporności oraz kodony będące pod działaniem doboru oczyszczającego (32 kodony), stanowiące potencjalne miejsca konserwatywne, dobre miejsca wiązania dla leków przeciwgruźliczych. Następnie przystąpiono do eksperymentalnej weryfikacji znaczenia mutacji w wybranych kodonach na fenotyp szczepów *M. tuberculosis* oraz aktywność rekombinowanych białek gyrazy DNA.

Po wprowadzeniu do genomu prątka gruźlicy mutacji w kodonach wybranych w analizach bioinformatycznych jako potencjalnie związanych z opornością, przystąpiono do weryfikacji poziomu wrażliwości otrzymanych szczepów na fluorochinolony: moksyflokscynę, lewoflokscynę, gatiflokscynę, ciproflokscynę, oflokscynę oraz gepotidacynę, związek z grupy nowych inhibitorów bakteryjnych topoizomeraz (NBTI). Ponadto oceniono kinetykę wzrostu mutantów w celu weryfikacji

wpływu mutacji na tempo wzrostu bakterii. Dodatkowo, celem udowodnienia bezpośredniego znaczenia wybranych substytucji na aktywność gyrazy DNA w obecności inhibitorów, oczyszczano rekombinowane białka GyrA i GyrB z substytucjami, które poddano szeregowi testów *in vitro*: superskręcania zrelaksowanego DNA plazmidowego, cięcia oraz dekatencji.

W przypadku potencjalnych miejsc konserwatywnych, otrzymanie szczepu z mutacją w takim miejscu powinno być niemożliwe, a spośród 32 kodonów wytypowanych *in silico* w przypadku siedmiu nie było możliwości uzyskania szczepu *M. tuberculosis* z mutacją. Miejsca te zostały przeanalizowane pod kątem znaczenia w aktywności gyrazy, a w tym celu oczyszczono białka rekombinowane GyrA oraz GyrB z wybranymi substytucjami. Testy *in vitro* wskazały na istotność sześciu kodonów znajdujących się w podjednostce B gyrazy DNA w procesie hydrolizy ATP i przekazywania sygnału wewnątrz białka, a wybrane substytucje powodowały brak aktywności enzymatycznej. Dla jednego kodonu znajdującego się w podjednostce A, pomimo zachowania aktywności enzymatycznej, gyraza z substytucją w tym miejscu charakteryzowała się zwiększoną zdolnością do wprowadzania cięć w DNA bez ponownego łączenia, co z kolei może mieć toksyczny wpływ dla komórki bakteryjnej.

Poszukiwania nowych inhibitorów gyrazy DNA prętka gruźlicy oparto o analizy dokowania molekularnego oraz wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji. Wybrane związki testowano pod kątem aktywności względem szczepu referencyjnego *M. tuberculosis* H37Rv oraz skonstruowanych szczepów warunkujących oporność. Związki o najwyższej skuteczności względem komórek bakteryjnych (najniższych wartościach MIC) sprawdzano pod kątem zdolności do inhibicji gyrazy DNA z wykorzystaniem testu *in vitro* (superskręcania plazmidowego DNA przez rekombinowaną gyrazę mykobakteryjną).

Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację dziewięciu mutacji w genach *gyrA* oraz *gyrB* związanych z pojawianiem się oporności: z czego trzy były związane z opornością na fluorochinolony (A90V, D94G/C w *gyrA*), jedna warunkowała wzrost oporności na gepotidacynę (Q565H w *gyrB*), a pięć mutacji (R446C/H/L, S447F/Y w *gyrB*) odpowiadało za wzrost oporności na fluorochinolony oraz gepotidacynę. W katalogu WHO, stanowiącym zbiór mutacji związanych z lekoopornością na szereg antybiotyków u szczepów prętka gruźlicy, sześć z nich (D94C w *gyrA* oraz R446C/H/L, S447Y, Q565H

w *gyrB*) zostało określonych jako substytucje o niepotwierdzonym znaczeniu w oporności na moksyflokscynę oraz lewofloksacynę. Otrzymane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki z wykorzystaniem metod molekularnych stanowią uzupełnienie danych WHO, do uwzględnienia w diagnostyce szczepów klinicznych. Ponadto zdefiniowano siedem miejsc konserwatywnych stanowiących dobre miejsca wiązania dla nowych leków, a metoda dokowania molekularnego pozwoliła na identyfikację dwóch inhibitorów gyrazy DNA zdolnych do zahamowania aktywności enzymu.

## 8. Abstrakt

*Mycobacterium tuberculosis* is the etiological agent of tuberculosis, which in 2024 caused 1.23 million deaths, and approximately 10.7 million people suffered from severe symptoms. Tuberculosis remains one of the 10 leading causes of death worldwide (WHO data for 2021). Growing drug resistance of strains is a serious problem, significantly hindering treatment and preventing the spread of infection. An important group of drugs used in the treatment of tuberculosis are fluoroquinolones, which target DNA gyrase, the only type II topoisomerase of *M. tuberculosis*.

This study aimed to assess the use of sequence variation analyses of the *gyrA* and *gyrB* genes (evolutionary patterning) to optimize tuberculosis chemotherapy by searching for new, effective DNA gyrase inhibitors, and to improve tuberculosis diagnosis by identifying resistance-associated mutations. This approach generated data that could help facilitate the fight against drug-resistant *M. tuberculosis*. Furthermore, it enabled the experimental evaluation of the effectiveness of the evolutionary patterning method and its potential application to the analysis of different *M. tuberculosis* genes and other pathogens.

First, *in silico* analyses based on evolutionary patterning identified DNA gyrase codons under the influence of positive selection (five codons), where mutations may be associated with the emergence of drug resistance, and codons under the influence of negative selection (32 codons), which constitute potential conservative sites and good binding sites for antituberculosis drugs. Next, we experimentally verify the significance of mutations in selected codons on the phenotype of *M. tuberculosis* strains and the activity of recombinant DNA gyrase proteins.

We introduce mutations potentially associated with resistance into the *M. tuberculosis* genome, and verify the sensitivity of the strains to fluoroquinolones: moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, as well as gepotidacin, a compound from the group of novel bacterial topoisomerase inhibitors (NBTIs). Furthermore, we assessed the growth kinetics of the mutants to verify the effect of the mutations on bacterial growth. Moreover, to demonstrate the direct significance of the selected substitutions on DNA gyrase activity in the presence of inhibitors, we purified recombinant GyrA and GyrB proteins with the substitutions and subjected them to a series of *in vitro* assays: relaxed plasmid DNA supercoiling, cleavage, and decatenation.

In the case of potential conservative sites, obtaining a strain with a mutation at such a site should have been impossible, and in seven out of 32 codons selected *in silico*, obtaining *M. tuberculosis* strain with a mutation was impracticable. These sites were analyzed for their significance in gyrase activity. For this purpose, we purified recombinant GyrA and GyrB proteins with selected substitutions. *In vitro* assays indicated the importance of six codons, located in the B subunit of gyrase, in ATP hydrolysis and intraprotein signaling, and the selected substitutions resulted in a lack of enzyme activity. For one codon located in the A subunit, despite retaining enzymatic activity, gyrase with a substitution at this site has an increased ability to introduce cuts into DNA without rejoining, which in turn may have a toxic effect on the bacterial cell.

The search for new inhibitors of *M. tuberculosis* DNA gyrase was based on molecular docking analyses and a trained artificial intelligence model. Then we tested selected compounds for activity against the reference *M. tuberculosis* H37Rv strain and engineered resistance strains. We also tested compounds with the highest efficacy against bacterial cells (lowest MIC values) for their ability to inhibit DNA gyrase using an *in vitro* assay (supercoiling of plasmid DNA by recombinant mycobacterial gyrases).

The obtained results allowed the identification of nine mutations in the *gyrA* and *gyrB* genes associated with the emergence of resistance, three of which are associated with resistance to fluoroquinolones (A90V, D94G/C in *gyrA*), one determined the increase in resistance to gepotidacin (Q565H in *gyrB*), and five mutations (R446C/H/L, S447F/Y in *gyrB*) are responsible for the increase in resistance to fluoroquinolones and gepotidacin. In the WHO catalog of mutations associated with drug resistance to a range of antibiotics in *Mycobacterium tuberculosis* strains, six of them (D94C in *gyrA* and R446C/H/L, S447Y, Q565H in *gyrB*) are identified as substitutions of uncertain significance in resistance to moxifloxacin and levofloxacin. The results obtained in this doctoral thesis using molecular methods complement the WHO data for use in the diagnosis of clinical strains. Furthermore, we defined seven conservative sites representing good binding sites for new drugs, and molecular docking allowed us to identify the two DNA gyrase compounds capable of inhibiting enzyme activity.

## 9. Bibliografia

1. Bloom B. R. *A half-century of research on tuberculosis: Successes and challenges*. Journal of Experimental Medicine 220(9):e20230859 (2023).
2. Trajman A., Campbell J. R., Kunor T., Ruslami R., Amanullah F., Behr M. A., Menzies D. *Tuberculosis*. The Lancet 405, 850–866 (2025).
3. Davidson G., Davidson D. U., Okoye O. K., Mensah L. S., Ukaegbu E. C., Agbor D. B.A, Adegbola M. O., Eneyo U. S., Osuluku B. A., Dinyain T. A., Okeke A. A., Okah M. J., Owulu A. I., Peterson J. C., Onyekweli S. O., Omoruyik G. O., Adebisi O. S., Atoyebi F. A., Omeje A. C., Ogbueli O. J., Odobuluo O. B., Uche C. J. *Overview of Tuberculosis: Causes, Symptoms and Risk Factors*. Asian Journal of Research in Infectious Diseases 15, 8–19 (2024).
4. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2025*. ISBN: 978-92-4-011692-4 (2025).
5. Nowiński A. *Gruźlica i Choroby Układu Oddechowego w Polsce w 2024 roku*. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, ISBN 978-83-957062-5-7 (2025).
6. Vanino E., Granozzi B., Akkerman O. W., Munoz-Torrico M., Palmieri F., Seaworth B., Tiberi S., Tadolini M. *Update of drug-resistant tuberculosis treatment guidelines: A turning point*. International Journal of Infectious Diseases 130, S12–S15 (2023).
7. World Health Organization. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis: Module 4: Treatment – Drug-Resistant Tuberculosis Treatment*. ISBN: 978-92-4-006312-9 (2022).
8. Guglielmetti L., Günther G., Leu C., Cirillo D., Duarte R., Garcia-Basteiro A. L., Goletti D., Jankovic M., Kuksa L., Maurer F. P., Méchaï F., Tiberi S., van Leth F., Veziris N., Lange C., on behalf of the Study Group on Mycobacteria of the European Society of Microbiology and Infectious Diseases (ESGMYC), European Society of Mycobacteriology (ESM), European Respiratory Society (ERS) and the Tuberculosis Network European Trials group (TBnet). *Rifapentine access in Europe: growing concerns over key tuberculosis treatment component*. European Respiratory Journal 59, 2200388 (2022).
9. Gupta A., Gupta A., Juneja S., Babawale V., Majidovich N. R., Ndjeka N., Nguyen P. T. M., Nusratovna P. N., Omanito D. R., Pakasi T. T., Terleeva Y., Toktogonova A., Waheed Y., Myint Z., Yanlin Z., Sahu S. *Global adoption of 6-month drug-resistant TB regimens: Projected uptake by 2026*. PLoS One 19, e0296448 (2024).
10. Poulton N. C., Rock J. M. *Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12: 997283 (2022).
11. Chimal-Muñoz M., Pérez-Martínez D. E., Hernández G. A. B., Mejía-Ponce P. M., Licona-Cassani C., Muñoz-Salazar R., Montero H., Zenteno-Cuevas R. *Whole-*

*Genome Sequence Analysis to Assess Mutations in Efflux Pumps in Mycobacterium tuberculosis: The Influence in Drug Resistance*. *Microorganisms*,13(6):1306 (2025).

12. De Gaetano G. V., Lentini G., Famà A., Coppolino F., Beninati C. *Antimicrobial Resistance: Two-Component Regulatory Systems and Multidrug Efflux Pumps*. *Antibiotics* 12(6):965 (2023).

13. Singh N., Mishra D. *Understanding Resistance Mechanisms in Mycobacterium Tuberculosis: A Comprehensive Review*. *International Journal of Pharmaceutical research and Applications* 8, 01–12 (2023).

14. Bhanu M., Kumari M. P., Begum T. *Anti-Tuberculosis Drugs and Mechanisms of Action: Review*. *International Journal of Infectious Diseases* 4, 1–7 (2023).

15. Karmakar M., Rodrigues C. H. M., Horan K., Denholm J. T., Ascher D. B. *Structure guided prediction of Pyrazinamide resistance mutations in pncA*. *Sci. Rep.* 10, 1875 (2020).

16. Rohde K. H., Sorci L. *The Prospective Synergy of Antitubercular Drugs With NAD Biosynthesis Inhibitors*. *Frontiers in Microbiology*, 11:634640 (2021).

17. Khoshnood S., Taki E., Sadeghifard N., Kaviar V. H., Haddadi M. H., Farshadzadeh Z., Kouhsari E., Goudarzi M., Heidary M. *Mechanism of Action, Resistance, Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Microbiol.*, 2:717045 (2021).

18. Mudde S. E., Upton A. M., Lenaerts A., Bax H. I., De Steenwinkel J. E. M. *Delamanid or pretomanid? A Solomonian judgement!* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77, 880–902 (2022).

19. Vilchèze, C., Jacobs Jr. W. R. *The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics*. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:35–50 (2007).

20. Stadler J. A. M., Maartens G., Meintjes G., Wasserman S. *Clofazimine for the treatment of tuberculosis*. *Front. Pharmacol.*, 14:1100488 (2023).

21. Bush N. G., Evans-Roberts K., Maxwell A. *DNA Topoisomerases*. *EcoSal Plus*, 6(2):10.1128 (2015).

22. Patel P. S., Krishnan R., Hakem R. *Emerging roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loops*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 876–877:503450 (2022).

23. Martinez-Garcia M., White C. I., Franklin F. C. H., Sanchez-Moran E. *The Role of Topoisomerase II in DNA Repair and Recombination in Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(23):13115 (2021).

24. Tan K., Cao N., Cheng B., Joachimiak A., Tse-Dinh Y. C. *Insights from the Structure of Mycobacterium tuberculosis Topoisomerase I with a Novel Protein Fold*. *J. Mol. Biol.*, 428: 182–193 (2016).

25. Kapopoulou A., Lew J. M., Cole S. T. *The MycoBrowser portal: A comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes*. *Tuberculosis* 91, 8–13 (2011).
26. The UniProt Consortium. *UniProt: The Universal Protein Resource (UniProtKB/Swiss-Prot entry P0A8V2)*. European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), SIB Swiss Institute of Bioinformatics, and PIR <https://www.uniprot.org/uniprot/P0A8V2> (2025).
27. Berman H. M. *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Res.*, 28:235–242 (2000).
28. Chadni S. H., Young M. A., Igorra P., Bhuiyan M. A. R., Kenyon V., Tse-Dinh Y-C. *Small Molecule Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis Topoisomerase I Identified by Machine Learning and In Vitro Assays*. *Int. J. Mol. Sci.*, 25(22):12265 (2024).
29. Faheem I., Leelaram M. N., Ratnakar I. S., Verma R., Nagaraja V. *Inhibition of DNA cleavage and strand passage activities of Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I*. *Nucleic Acids Res.*, 53(17): gkaf929 (2025).
30. Dasgupta T., Ferdous S., Tse-Dinh Y-C. *Mechanism of Type IA Topoisomerases*. *Molecules* 25:4769 (2020).
31. Rani P., Kalladi S. M., Bansia H, Rao S., Jha R. K., Jain P., Bhaduri T., Nagaraja V. *A multifunctional type IA DNA/RNA topoisomerase with RNA hydrolysis and rRNA processing activities from Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium tuberculosis*. *bioRxiv*, doi:10.1101/2020.07.13.199935 (2020).
32. Ferdous S., Dasgupta T., Annamalai T., Tan K., Tse-Dinh Y-C. *The interaction between transport-segment DNA and topoisomerase IA—crystal structure of MtbTOP1 in complex with both G- and T-segments*. *Nucleic Acids Res.*, 51:349–364 (2023).
33. Faheem I., Nagaraja V. *Multifunctional Mycobacterial Topoisomerases with Distinctive Features*. *ACS Infect. Dis.*, 11:366–385 (2025).
34. Muralikrishnan B., Edison L. K., Dusthacker A., Jijimole G. R., Ramachandran R., Madhavan A., Kumar R. A. *Chrysoomycin A inhibits the topoisomerase I of Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antibiot.*, 75:226–235 (2022).
35. Gupta R., Felix C. R., Akerman M. P., Akerman K. J., Slabber C. A., Wang W., Adams J., Shaw L. N., Tse-Dinh Y-C., Munro O. Q., Rohde K. H. *Evidence for Inhibition of Topoisomerase IA by Gold(III) Macrocycles and Chelates Targeting Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 62(5):e01696-17 (2018).
36. Garcia, P. K., Annamalai T., Wang W., Bell S. R., Le D, Pancorbo P. M., Sikandar S., Seddek A., Yu X., Sun D., Uhlemann A. C., Tiwari P. B., Leng F., Tse-Dinh Y-C. *Mechanism and resistance for antimycobacterial activity of a fluoroquinolone phenoxazine compound*. *PLoS One*, 14(2):e0207733 (2019).

37. Godbole A. A., Ahmed W., Bhat R. S., Bradley E. K., Ekins S., Nagaraja V. *Targeting Mycobacterium tuberculosis Topoisomerase I by Small-Molecule Inhibitors*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59:1549–1557 (2015).
38. García M. T., Carreño D., Tirado-Vélez J. M., Ferrándiz M. J., Rodrigues L., Gracia B., Amblar M., Ainsa J. A., de la Campa A. G. *Boldine-Derived Alkaloids Inhibit the Activity of DNA Topoisomerase I and Growth of Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Microbiol.*, 9 :1659 (2018).
39. Maurya, V., Singh R., Singh K. R., Pandey S., Yadav P., Parashar P., Gaiind R., Dubey K. D., Patwari G. N., Tandon V. *Unraveling topoisomerase IA gate dynamics in presence of PPEF and its preclinical evaluation against multidrug-resistant pathogens*. *Commun. Biol.*, 6:195 (2023).
40. Sandhaus S., Annamalai T., Welmaker G., Houghten R. A., Paz C., Garcia P. K., Andres A., Narula G., Felix C. R., Geden S., Netherton M., Gupta R., Rohde K. H., Giulianotti M. A., Tse-Dinh Y-C. *Small-Molecule Inhibitors Targeting Topoisomerase I as Novel Antituberculosis Agents*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60:4028–4036 (2016).
41. Leelaram M. N., Bhat A. G., Godbole A. A., Bhat R. S., Manjunath R., Nagaraja V. *Type IA topoisomerase inhibition by clamp closure*. *The FASEB Journal* 27(8):3030–3038 (2013).
42. Garcia P. K., Borrero R. M., Annamalai T., Diaz E., Balarezo S., Tiwari P. B., Tse-Dinh Y-C. *Localization of Mycobacterium tuberculosis topoisomerase I C-terminal sequence motif required for inhibition by endogenous toxin MazF4*. *Front. Microbiol.* 13:1032320 (2022).
43. Spencer A. C., Panda S. S. *DNA Gyrase as a Target for Quinolones*. *Biomedicines* 11(2):371 (2023).
44. Salman M., Sharma P., Kumar M., Ethayathulla A. S., Kaur P. *Targeting novel sites in DNA gyrase for development of anti-microbials*. *Brief. Funct. Genomics* 22:180–194 (2023).
45. Kamsri B., Kamsri P., Punkvang A., Chimprasit A., Saparpakorn P., Hannongbua S., Spencer J., Oliveira A. S. F., Mulholland A. J., Pungpo P. *Signal Propagation in the ATPase Domain of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase from Dynamical-Nonequilibrium Molecular Dynamics Simulations*. *Biochemistry* 63(11):1493–1504 (2024).
46. Fu, G. et al. *Crystal structure of DNA gyrase B' domain sheds lights on the mechanism for T-segment navigation*. *Nucleic Acids Res.* 37, 5908–5916 (2009).
47. Sissi C., Perdonà E., Domenici E., Feriani A., Howells A. J., Maxwell A., Palumbo M. *Ciprofloxacin affects conformational equilibria of DNA gyrase A in the presence of magnesium ions*. *J. Mol. Biol.* 311(1):195–203 (2001).

48. Huang Y-Y., Deng J-Y., Gu J., Zhang Z-P., Maxwell A., Bi L-J., Chen Y-Y., Zhou Y-F., Yu Z-N., Zhang X-E. *The key DNA-binding residues in the C-terminal domain of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase A subunit (GyrA)*. *Nucleic Acids Res.* 34(19):5650–5659 (2006).
49. Champoux J. J. *DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism*. *Annu. Rev. Biochem.* 70:369–413 (2001).
50. Collin F., Karkare S., Maxwell A. *Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92:479–497 (2011).
51. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. *DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs*. *Chem. Biol.* 17:421–433 (2010).
52. Geremia N., Giovagnorio F., Colpani A., De Vito A., Botan A., Stroffolini G., Toc D-A., Zerbato V., Principe L., Madeddu G., Luzzati R., Parisi S. G., Di Bella S. *Fluoroquinolones and Biofilm: A Narrative Review*. *Pharmaceuticals* 17(12):1673 (2024).
53. Bush N. G., Diez-Santos I., Abbott L. R., Maxwell A. *Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance*. *Molecules* 25, 5662 (2020).
54. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B. A., Thiessen P. A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E. E. *PubChem 2025 update*. *Nucleic Acids Res.* 53:D1516–D1525 (2025).
55. Al-Shaer M. H., Alghamdi W. A., Alsultan A., An G., Ahmed S., Alkabab Y., Banu S., Barbakadze K., Houpt E., Kipiani M., Mikiashvili L., Cegielski J. P., Kempker R. R., Heysell S. K., Peloquin C. A. *Fluoroquinolones in Drug-Resistant Tuberculosis: Culture Conversion and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Target Attainment To Guide Dose Selection*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 63(7):e00279-19 (2019).
56. Peloquin C. A., Phillips P. P. J., Mitnick C. D., Eisenach K., Patientia R. F., Lecca L., Gotuzzo E., Gandhi N. R., Butler D., Diacon A. H., Martel B., Santillan J., Hunt K. R., Vargas D., von Groote-Bidlingmaier F., Seas C., Dianis N., Moreno-Martinez A., Kaur P., Horsburgh C. R. *Increased Doses Lead to Higher Drug Exposures of Levofloxacin for Treatment of Tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 62(10):e00770-18 (2018).
57. Food and Drug Administration (FDA). *FDA Drug Safety Communication: FDA Updates Warnings for Oral and Injectable Fluoroquinolone Antibiotics Due to Disabling Side Effects Safety Announcement*. Safety Announcement; 26 Jul 2016 [cited 1 Feb 2026]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-updates-warnings-oral-and-injectable-fluoroquinolone-antibiotics>
58. Guo I. J., Maximos M., Gamble J-M. *Examining hypoglycemia risk with systemic fluoroquinolone use: A systematic review and meta-analysis*. *CMI Communications*, 1(2):105038 (2024).

59. Nie L., Tong J., Wu G., Du J., Shang Y., Wang Y., Wu Z., Xu Y., Ren Y., Rao Y., Pang Y., Gao M. *Early bactericidal activity of sitafloxacin against pulmonary tuberculosis*. *Microbiol. Spectr.*, 13(1):e0164524 (2025).
60. Sun Q., Cheng K., Liao X., Zhao W., Wang C., Wang C., Yan J., Dong L., Wang F., Jiang G., Huang H., Guo Z., Wang G. *New generation fluoroquinolone sitafloxacin could potentially overcome the majority levofloxacin and moxifloxacin resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.*, 73(7). doi: 10.1099/jmm.0.001825 (2024).
61. Kuhn E. M. A., Sominsky L. A., Chittò M., Schwarz E. M., Moriarty T. F. *Antibacterial Mechanisms and Clinical Impact of Sitafloxacin*. *Pharmaceuticals* 17:1537 (2024).
62. Kong Y., Geng Z., Jiang G., Jia J., Wang F., Jiang X., Gu Y., Qi Z., Chu N., Huang H., Yu X. *Comparison of the in vitro antibacterial activity of ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, sitafloxacin, finafloxacin, and delafloxacin against Mycobacterium tuberculosis strains isolated in China*. *Heliyon*, 9(11):e21216 (2023).
63. McKeage K. *Finafloxacin: First Global Approval*. *Drugs* 75:687–693 (2015).
64. Kaul G., Kapoor E., Dasgupta A., Chopra, S. *Delafloxacin meglumine for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections (ABSSSI)*. *Drugs of Today* 54(11):657-666 (2018).
65. Kokot M., Hrast Rambaher M., Feng L., Mitchenall L. A., Lawson D. M., Maxwell A., Parish T., Minovski N., Anderluh M. *Structural Aspects of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase Targeted by Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors*. *ACS Med. Chem. Lett.*, 15(12):2164-2170 (2024).
66. Kolarič A., Anderluh M., Minovski, N. *Two Decades of Successful SAR-Grounded Stories of the Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors (NBTIs)*. *J. Med. Chem.*, 63:5664–5674 (2020).
67. Ganapathy U. S., González-Del Río R., Cacho-Izquierdo M., Ortega F., Lelièvre J., Barros-Aguirre D., Aragaw W. W., Zimmerman M. D., Lindman M., Dartois V., Gengenbacher M., Dick T. *A Mycobacterium tuberculosis NBTI DNA Gyrase Inhibitor Is Active against Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 65(12):e01514-21 (2021).
68. Kumari C., Tariq T., Memon, M. *New Era for Urinary Tract Infection Treatment: Gepotidacin Receives FDA Approval*. *International Urogynecology Journal*, <https://doi.org/10.1007/s00192-025-06388-4> (2025).
69. Perry C. R., Scangarella-Oman N. E., Millns H., Flight W., Gatsi S., Jakielaszek C., Janmohamed S., Lewis D. A. *Efficacy and Safety of Gepotidacin as Treatment of Uncomplicated Urogenital Gonorrhoea (EAGLE-1): Design of a Randomized, Comparator-Controlled, Phase 3 Study*. *Infect. Dis. Ther.*, 12(9):2307-2320 (2023).

70. Vanden Broeck A., McEwen A. G., Chebaro Y., Potier N., Lamour V. *Structural Basis for DNA Gyrase Interaction with Coumermycin A1*. J. Med. Chem., 62(8):4225–4231 (2019).
71. Chopra S., Matsuyama K., Tran T., Malerich J. P., Wan B., Franzblau S. G., Lun S., Guo H., Maiga M. C., Bishai W. R., Madrid P. B. *Evaluation of gyrase B as a drug target in Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(2):415–421 (2012).
72. Cloete R., Shahbaaz M., Grobbelaar M., Sampson S. L., Christoffels A. *In silico repurposing of a Novobiocin derivative for activity against latency associated Mycobacterium tuberculosis drug target nicotinate-nucleotide adenyl transferase (Rv2421c)*. PLoS One, 16(11):e0259348 (2021).
73. May J. M., Sherman D. J., Li S., Tran R., Sham L.-T., Radey M. C., Rojas E. R., Kahne D., Ruiz N. *The Antibiotic Novobiocin Binds and Activates the ATPase That Powers Lipopolysaccharide Transport*. J. Am. Chem. Soc. 139(48):17221–17224 (2017).
74. Govender P., Müller R., Singh K., Reddy V., Eyermann C. J., Fienberg S., Ghorpade S. R., Koekemoer L., Myrick A., Schnappinger D., Engelhart C., Meshanni J., Byl J. A. W., Osheroff N., Singh V., Chibale K., Basarab G. S. *Spiropyrimidinetrione DNA Gyrase Inhibitors with Potent and Selective Antituberculosis Activity*. J. Med. Chem. 65(9):6903-6925 (2022).
75. Bradford P. A., Miller A. A., O'Donnell J., Mueller J. P. *Zoliflodacin: An Oral Spiropyrimidinetrione Antibiotic for the Treatment of Neisseria gonorrhoeae, Including Multi-Drug-Resistant Isolates*. ACS Infect. Dis., 6(6):1332-1345 (2020).
76. Byl J. A. W., Mueller R., Bax B., Basarab G. S., Chibale K., Osheroff N. *A Series of Spiropyrimidinetriones that Enhances DNA Cleavage Mediated by Mycobacterium tuberculosis Gyrase*. ACS Infect. Dis., 9(3):706-715 (2023).
77. Imai Y., Hauk G., Quigley J., Liang L., Son S., Ghiglieri M., Gates M. F., Morrisette M., Shahsavari N., Niles S., Baldisseri D., Honrao C., Ma X., Guo J. J., Berger J. M., Lewis K. *Evybactin is a DNA gyrase inhibitor that selectively kills Mycobacterium tuberculosis*. Nat. Chem. Biol., 8(11):1236-1244 (2022).
78. Hameed P. S., Solapure S., Mukherjee K., Nandi V., Waterson D., Shandil R., Balganes M., Sambandamurthy V. K., Raichurkar A. K., Deshpande A., Ghosh A., Awasthy D., Shanbhag G., Sheikh G., McMiken H., Puttur J., Reddy J., Werngren J., Read J., Kumar M., Manjunatha R., Chinnapattu M., Madhavapeddi P., Manjrekar P., Basu R., Gaonkar S., Sharma S., Hoffner S., Humnabadkar V., Subbulakshmi V., Panduga V. *Optimization of Pyrrolamides as Mycobacterial GyrB ATPase Inhibitors: Structure-Activity Relationship and In Vivo Efficacy in a Mouse Model of Tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother., 58(1):61–70 (2014).
79. Kale R. R., Kale M. G., Waterson D., Raichurkar A., Hameed S. P., Manjunatha M. R., Reddy B. K. K., Malolanarasimhan K., Shinde V., Koushik K., Jena L. K.,

- Menasinakai S., Humnabadkar V., Madhavapeddi P., Basavarajappa H., Sharma S., Nandishaiah R., Kumar K. N. M., Ganguly S., Ahuja V., Gaonkar S., Kumar C. N. N., Ogg D., Boriack-Sjodin P. A., Sambandamurthy V. K., de Sousa S. M., Ghorpade S. R. *Thiazolopyridone ureas as DNA gyrase B inhibitors: Optimization of antitubercular activity and efficacy*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24(3):870–879 (2014).
80. Pakamwong B., Thongdee P., Kamsri B., Phusi N., Taveepanich S., Chayajarus K., Kamsri P., Punkvang A., Hannongbua S., Sangswan J., Suttisintong K., Sureram S., Kittakoo P., Hongmanee P., Santanirand P., Leanpolchareanchai J., Spencer J., Mulholland A. J., Pungpo P. *Ligand-Based Virtual Screening for Discovery of Indole Derivatives as Potent DNA Gyrase ATPase Inhibitors Active against Mycobacterium tuberculosis and Hit Validation by Biological Assays*. *J. Chem. Inf. Model.*, 64(15):5991-6002 (2024).
81. Chatterji M., Unniraman S., Mahadevan S., Nagaraja V. *Effect of different classes of inhibitors on DNA gyrase from Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4):479–485 (2001).
82. Manjunatha U. H., Mahadevan S., Visweswariah S. S., Nagaraja V. *Monoclonal antibodies to mycobacterial DNA gyrase A inhibit DNA supercoiling activity*. *Eur. J. Biochem.*, 268(7):2038–2046 (2001).
83. Feng L., Mundy J. E. A., Stevenson C. E. M., Mitchenall L. A., Lawson D. M., Mi K., Maxwell A. *The pentapeptide-repeat protein, MfpA, interacts with mycobacterial DNA gyrase as a DNA T-segment mimic*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(11):e2016705118 (2021).
84. Sengupta S., Shah M., Nagaraja, V. *Glutamate racemase from Mycobacterium tuberculosis inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding*. *Nucleic Acids Res.*, 34(19):5567–5576 (2006).
85. Singh A., Gupta A. K., Singh, S. *Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Role of Nanoparticles Against Multi-Drug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB)*. *NanoBioMedicine*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9898-9_12) (2020).
86. Chong Y., Li X., Long Y., Pei S., Ren Q., Feng F., Zhang H. *Identification of novel resistance-associated mutations and discrimination within whole-genome sequences of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates*. *Microbiol. Spectr.*, 12(6):e0393023 (2024).
87. World Health Organization. *Catalogue of Mutations in Mycobacterium Tuberculosis Complex and Their Association with Drug Resistance, 2nd Ed.* ISBN: 9789240082410 (2023).
88. Lu J., Liu M., Wang Y., Pang Y., Zhao, Z. *Mechanisms of fluoroquinolone monoresistance in Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 353(1):40–48 (2014).

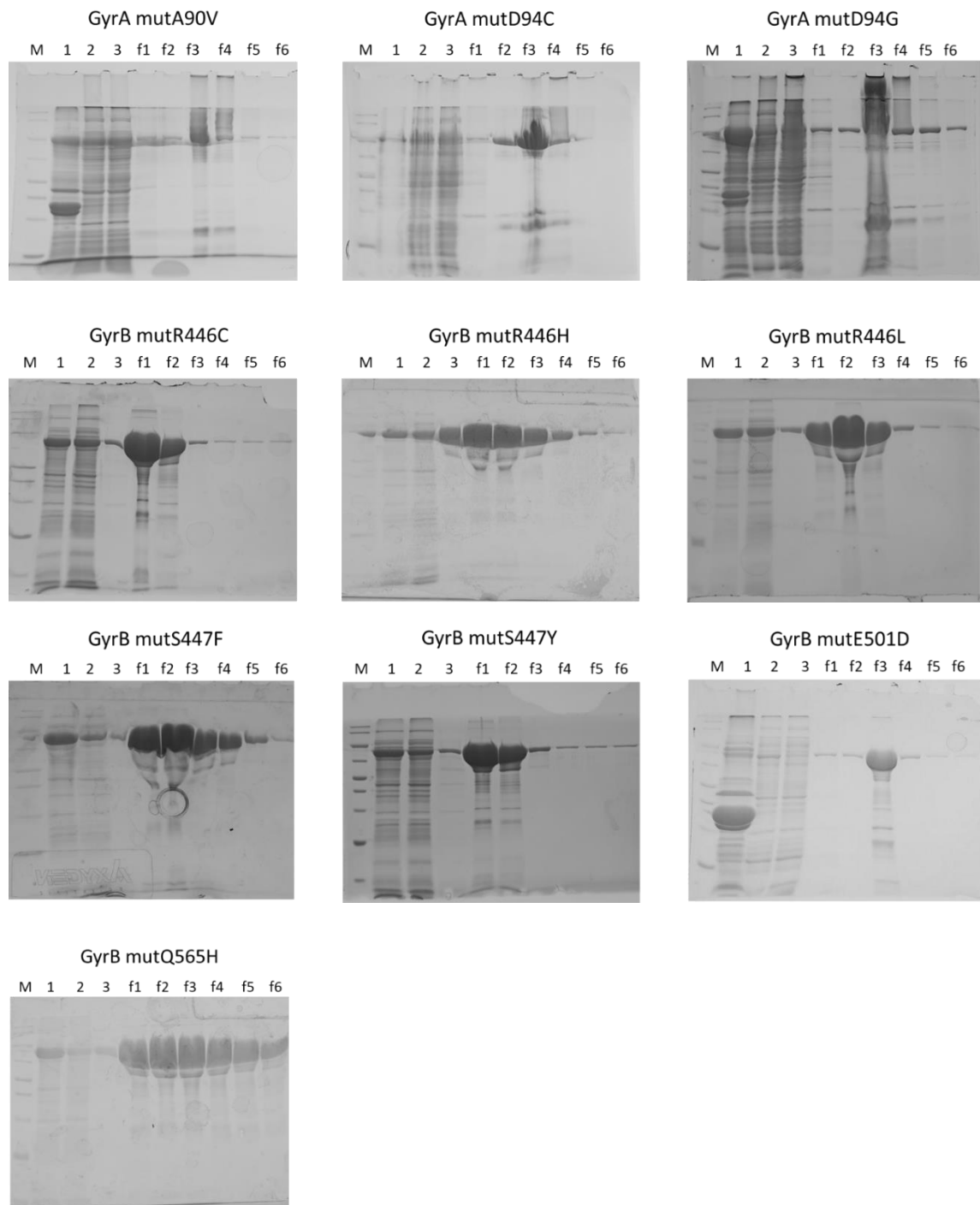
89. Hegde S. S., Vetting M. W., Roderick S. L., Mitchenall L. A., Maxwell A., Takiff H. E., Blanchard J. S. *A Fluoroquinolone Resistance Protein from Mycobacterium tuberculosis That Mimics DNA*. *Science*, 308(5727):1480-1483 (2005).
90. Jha A. K., Faheem I., Nagaraja V. *Succinylation of GyrB Is a Mechanism Conferring Fluoroquinolone Resistance*. *ACS Infect. Dis.*, 11(12) doi:10.1021/acsinfecdis.5c00781 (2015)
91. Futuyma D. J. *Ewolucja*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, doi:10.1093/icb/icp095 (2005).
92. Oliveira M., Antunes W., Mota S., Madureira-Carvalho Á., Dinis-Oliveira R. J., Dias da Silva D. *An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance*. *Microorganisms*, 12(9):1920 (2024).
93. Durand P. M., Naidoo K., Coetzer T. L. *Evolutionary Patterning: A Novel Approach to the Identification of Potential Drug Target Sites in Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 3(11):e3685 (2008).
94. Kimura M. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. *Sci. Am.*, 241:98–126 (1979).
95. Niemann S., Supply P. *Diversity and Evolution of Mycobacterium tuberculosis: Moving to Whole-Genome-Based Approaches*. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 4:a021188–a021188 (2014).
96. Bendl J., Stourac J., Salanda O., Pavelka A., Wieben E. D., Zendulka J., Brezovsky J., Damborsky J. *PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations*. *PLoS Comput. Biol.*, 10(1):e1003440 (2014).
97. Bachorz R. A., Pastwińska J., Nowak D., Karaś K., Karwaciak I., Ratajewski M. *The application of machine learning methods to the prediction of novel ligands for ROR $\gamma$ /ROR $\gamma$ T receptors*. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 21:5491-5505 (2023).
98. Green R., Rogers E. J. *Transformation of Chemically Competent E. coli*. *Methods Enzymol.*, 529:329-36 (2013).
99. Parish T., Roberts D. M. *Mycobacteria Protocols, 3<sup>rd</sup> edition*. Springer, Methods in Molecular Biology, Vol. 1285. New York (NY), doi:10.1007/978-1-4939-2450-9 (2015).
100. Parish T., Stoker N. G. *Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement*. *Microbiology*, 146:1969–1975 (2000).
101. Sheffield P., Garrard S., Derewenda, Z. *Overcoming Expression and Purification Problems of RhoGDI Using a Family of “Parallel” Expression Vectors*. *Protein Expr. Purif.* 15:34–39 (1999).
102. Livak K. J., Schmittgen T. D. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> Method*. *Methods* 25:402–408 (2001).

103. Petrella S., Capton E., Raynal B., Giffard C., Thureau A., Bonneté F., Alzari P. M., Aubry A., Mayer C. *Overall Structures of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase Reveal the Role of a Corynebacteriales GyrB-Specific Insert in ATPase Activity*. *Structure*, 27(4):579-589.e5 (2019).
104. Agrawal A., Roué M., Spitzfaden C., Petrella S., Aubry A., Hann M., Bax B., Mayer C. *Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase ATPase domain structures suggest a dissociative mechanism that explains how ATP hydrolysis is coupled to domain motion*. *Biochemical Journal*, 456(2):263-273 (2013).
105. Minias A., Minias P., Czubat B., Dziadek J. *Purifying Selective Pressure Suggests the Functionality of a Vitamin B12 Biosynthesis Pathway in a Global Population of Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Biol. Evol.* 10:2326–2337 (2018).
106. Mcule. *Mcule database*. <https://mcule.com/> (2026).
107. Malik S., Willby M., Sikes D., Tsodikov O. V., Posey J. E. *New Insights into Fluoroquinolone Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Functional Genetic Analysis of gyrA and gyrB Mutations*. *PLoS One*, 7(6):e39754 (2012).
108. Lee M. H., Pascopella L., Jacobs W. R., Hatfull G. F. *Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium tuberculosis, and bacille Calmette-Guérin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88:3111–3115 (1991).
109. Sirgel F. A., Warren R. M., Streicher E. M., Victor T. C., van Helden P. D., Böttger E. C. *gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(5):1088–1093 (2012).
110. The CRyPTIC Consortium. *Epidemiological cut-off values for a 96-well broth microdilution plate for high-throughput research antibiotic susceptibility testing of M. tuberculosis*. *European Respiratory Journal* 60(4):2200239 (2022).
111. Katale B. Z., Mbelele P. M., Lema N. A., Campino S., Mshana S. E., Rweyemamu M. M., Phelan J. E., Keyyu J. D., Majigo M., Mbugi E. V., Dockrell H. M., Clark T. G., Matee M. I., Mpagama S. *Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis isolates and clinical outcomes of patients treated for multidrug-resistant tuberculosis in Tanzania*. *BMC Genomics*, 21(1):174 (2020).
112. CRyPTIC Consortium. *Quantitative measurement of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis reveals genetic determinants of resistance and susceptibility in a target gene approach*. *Nat. Commun.* 15(1):488 (2024).
113. Piton J., Petrella S., Delarue M., André-Leroux G., Jarlier V., Aubry A., Mayer C. *Structural Insights into the Quinolone Resistance Mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase*. *PLoS One*, 5(8):e12245 (2010).

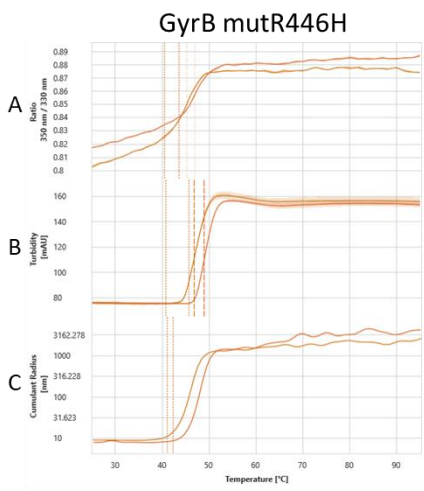
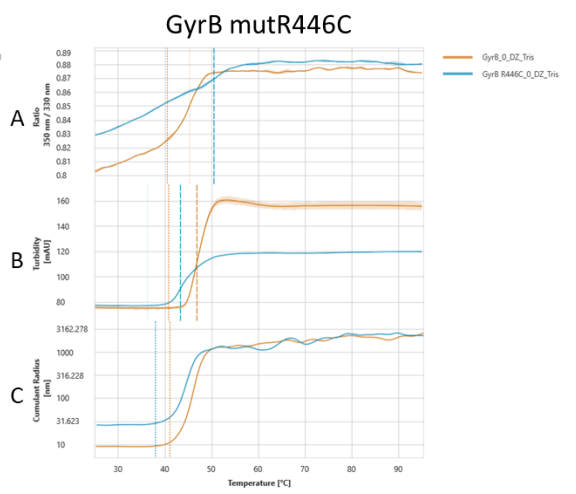
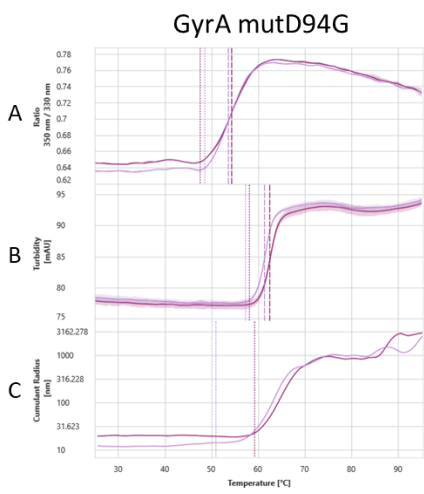
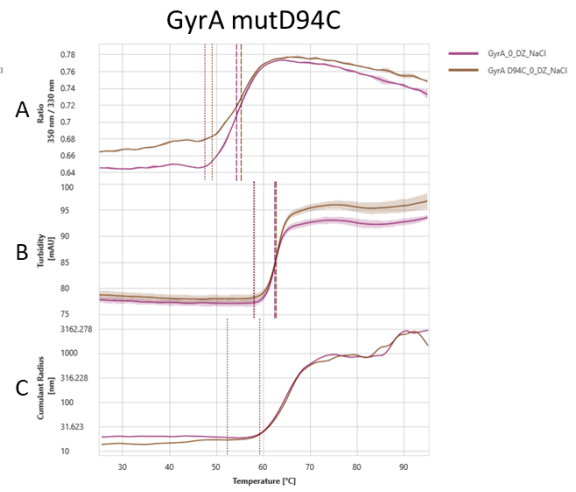
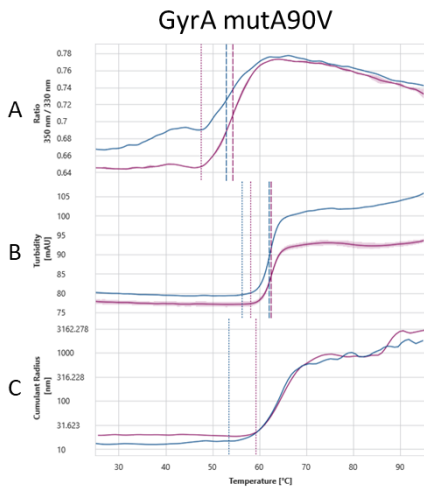
114. Zhang Z., Lu J., Wang Y., Pang Y., Zhao Y. *Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates in China*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58:364–369 (2014).
115. World Health Organization. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 3: Diagnosis – Rapid Diagnostics for Tuberculosis Detection, Third Edition*. ISBN: 9789240089488 (2024).
116. World Health Organization. *Xpert MTB/RIF Implementation Manual: Technical and Operational ‘How-to’; Practical Considerations*. ISBN: 978-92-4-150670-0 (2014).
117. Puyén Z. M., Santos-Lázaro D., Vigo A. N., Cotrina V. V., Ruiz-Nizama N., Alarcón M. J., Asto B., Huamán T., Moore D. A. J. *Whole Genome Sequencing of Mycobacterium tuberculosis under routine conditions in a high-burden area of multidrug-resistant tuberculosis in Peru*. *PLoS One*, 19(6):e0304130 (2024).
118. Georghiou S. B., Tukvadze N., Rodrigues C., Omar S. V., Cabibbe A. M., Seifert M., Uplekar S., Ismail N., Ruhwald M., Suresh A., Colman R. E. *Targeted next-generation sequencing for drug-resistant tuberculosis diagnosis: implementation considerations for bacterial load, regimen selection and diagnostic algorithm placement*. *BMJ Glob. Health* 10(11):e019135 (2025).
119. Nilgiriwala K., Rabodoarivelo M.-S., Hall M. B., Patel G., Mandal A., Mishra S., Andrianomanana F. R., Dingle K., Rodger G., George S., Crook D. W., Hoosdally S., Mistry N., Rakotosamimanana N., Iqbal Z., Grandjean Lapierre S., Walker T. M. *Genomic Sequencing from Sputum for Tuberculosis Disease Diagnosis, Lineage Determination, and Drug Susceptibility Prediction*. *J. Clin. Microbiol.*, 61(3):e0157822 (2023).
120. World Health Organization. *The End TB Strategy: Global Strategy and Targets for Tuberculosis Prevention, Care and Control after 2015*. Report by the Secretariat, EB134/12 (2013).
121. Aubry A., Veziris N., Cambau E., Truffot-Pernot C., Jarlier V., Fisher L. M. *Novel Gyrase Mutations in Quinolone-Resistant and -Hypersusceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis: Functional Analysis of Mutant Enzymes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50(1):104–112 (2006).
122. Mdluli K., Ma Z. *Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase as a Target for Drug Discovery*. *Infect. Disord. Drug Targets*, 7(2):159–168 (2007).
123. Karkare S., Yousafzai F., Mitchenall L. A., Maxwell A. *The role of Ca<sup>2+</sup> in the activity of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase*. *Nucleic Acids Res.*, 40:9774–9787 (2012).
124. Aubry A., Pan X-S., Fisher L. M., Jarlier V., Cambau E. *Mycobacterium tuberculosis DNA Gyrase: Interaction with Quinolones and Correlation with Antimycobacterial Drug Activity*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(4):1281–1288 (2004).

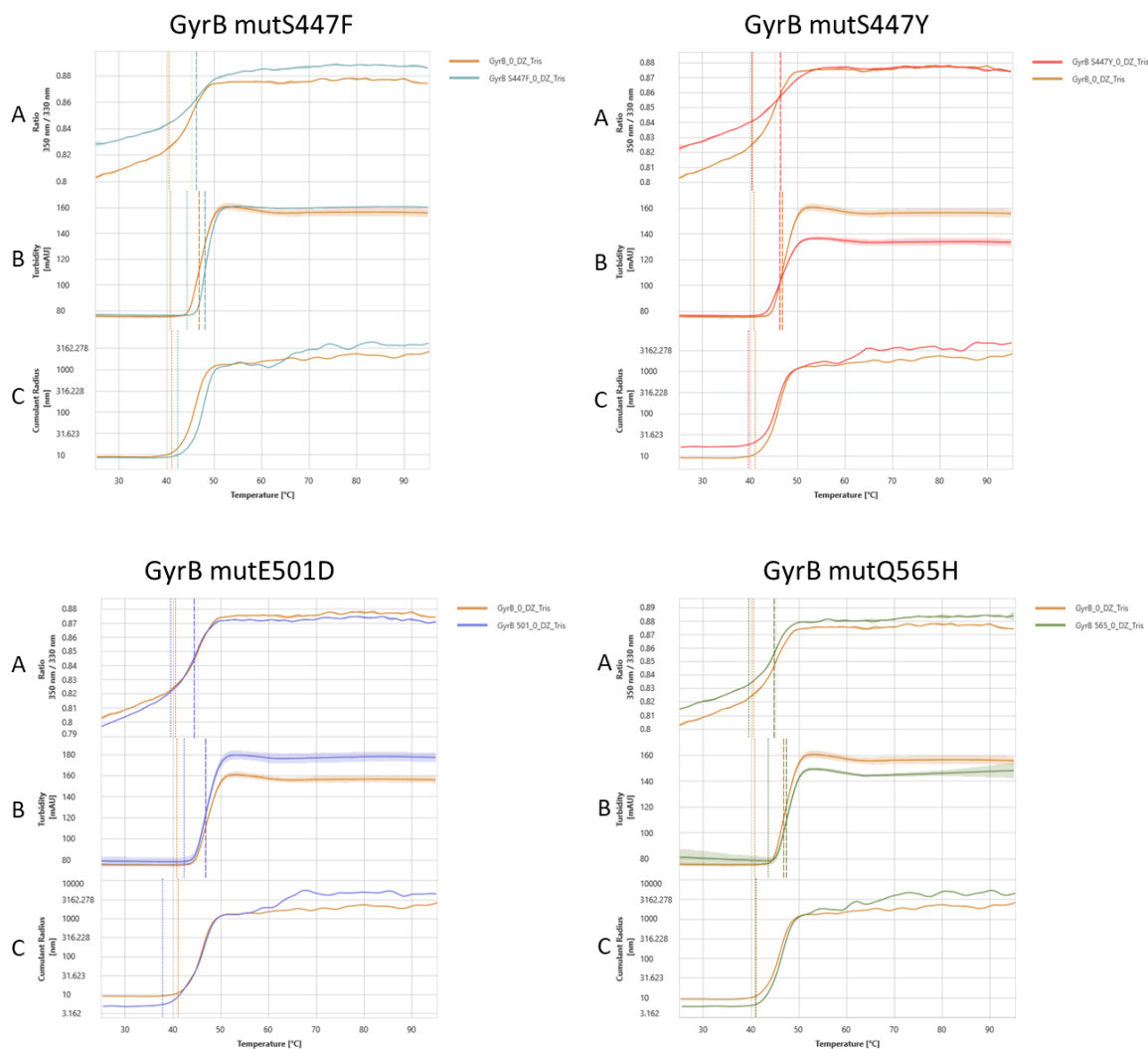
125. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K. E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., Yeboah-Manu D., Bothamley G., Mei J., Wei L., Bentley S., Harris S. R., Niemann S., Diel R., Aseffa A., Gao Q., Young D., Gagneux S. *Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans*. Nat. Genet., 45(10):1176–1182 (2013).
126. Qiu X., Zhang Q., Li Z., Zhang J., Liu H. *Revealing the Interaction Mechanism between Mycobacterium tuberculosis GyrB and Novobiocin, SPR719 through Binding Thermodynamics and Dissociation Kinetics Analysis*. Int. J. Mol. Sci., 25(7):3764 (2024).
127. Xu W.-X., Zhang L., Mai J.-T., Peng R.-C., Yang E.-Z., Peng C., Wang H.-H. *The Wag31 protein interacts with AccA3 and coordinates cell wall lipid permeability and lipophilic drug resistance in Mycobacterium smegmatis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 448(3):255–260 (2014).
128. Gedeon A., Yab E., Dinut A., Sadowski E., Capton E., Dreneau A., Petit J., Gioia B., Piveteau C., Djaout K., Lecat E., Wehenkel A. M., Gubellini F., Mechaly A., Alzari P. M., Deprez B., Baulard A., Aubry A., Willand N., Petrella S. *Molecular mechanism of a triazole-containing inhibitor of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase*. iScience 27(10):110967 (2024).
129. Trenado-Urbe M., Silva-Miranda M., Rivero-Cruz J. F., Rodríguez-Peña K., Espitia-Pinzón C. I., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S. *Antimycobacterial activity of an anthracycline produced by an endophyte isolated from Amphipterygium adstringens*. Mol. Biol. Rep., 45(6):2563–2570 (2018).
130. Balasubramani G. I., Rajput R., Gupta M., Dahiya P., Thakur J. K., Bhatnagar R., Grover A. *Structure-based drug repurposing to inhibit the DNA gyrase of Mycobacterium tuberculosis*. Biochemical Journal, 477(21):4167–4190 (2020).
131. Palková Z. *Multicellular microorganisms: laboratory versus nature*. EMBO Rep., 5(5):470–476 (2004).

## Suplement

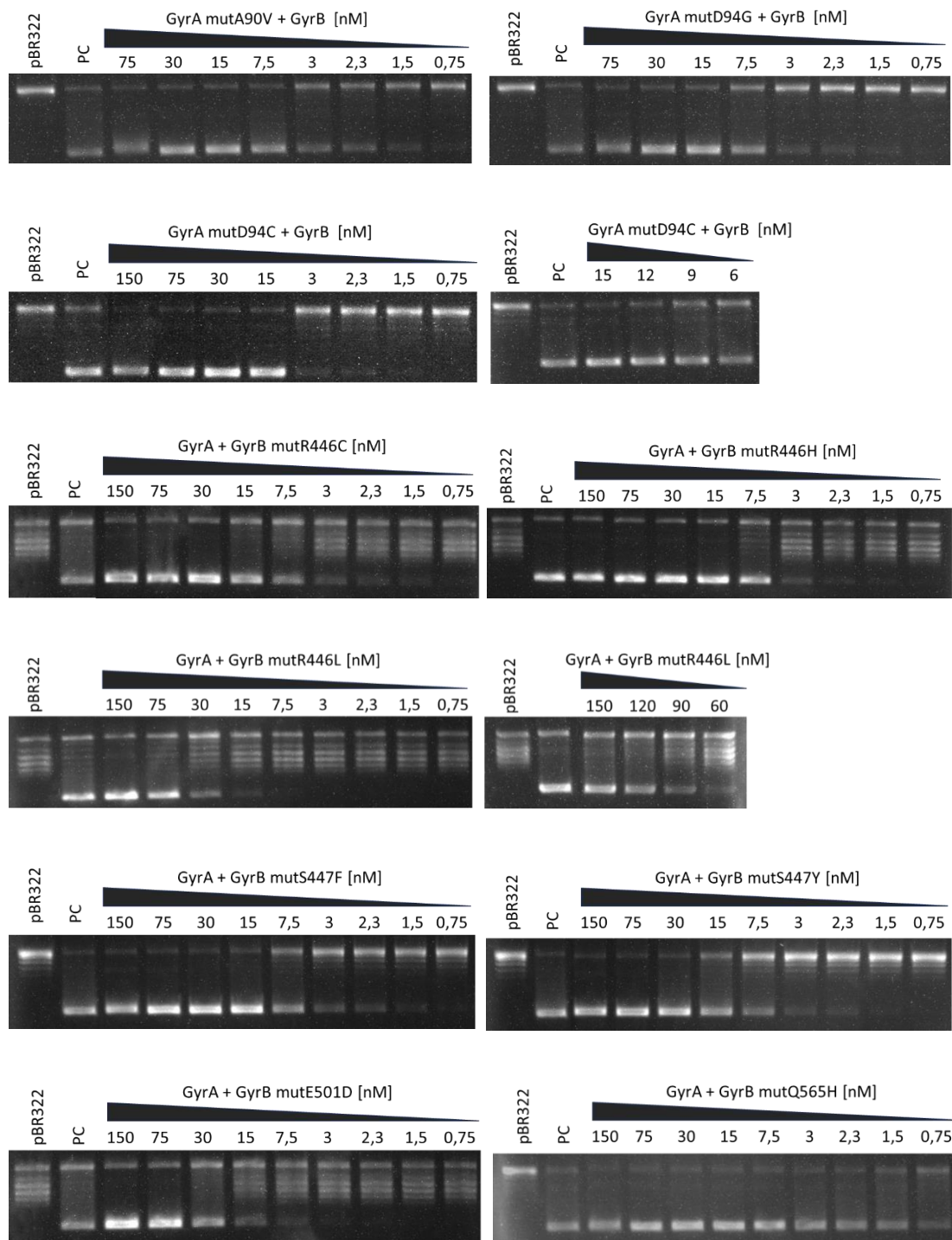


Rycina S1. Rozdział elektroforetyczny frakcji białek GyrA (92 kDa) i GyrB (74 kDa) z wybranymi substytucjami (po oczyszczeniu metodą chromatografii metalopowinowactwa) w 12% żelu poliakrylamidowym. M – wzorec wielkości PageRuler, 1 – całkowita zawartość białka otrzymana po nadprodukcji, 2 – białka niezwiązane ze złożem agarozowym wysyconym jonami niklu, 3 – białka wymyte ze złoża podczas płukania, f1-f6 – kolejne frakcje białka po elucji ze złoża.

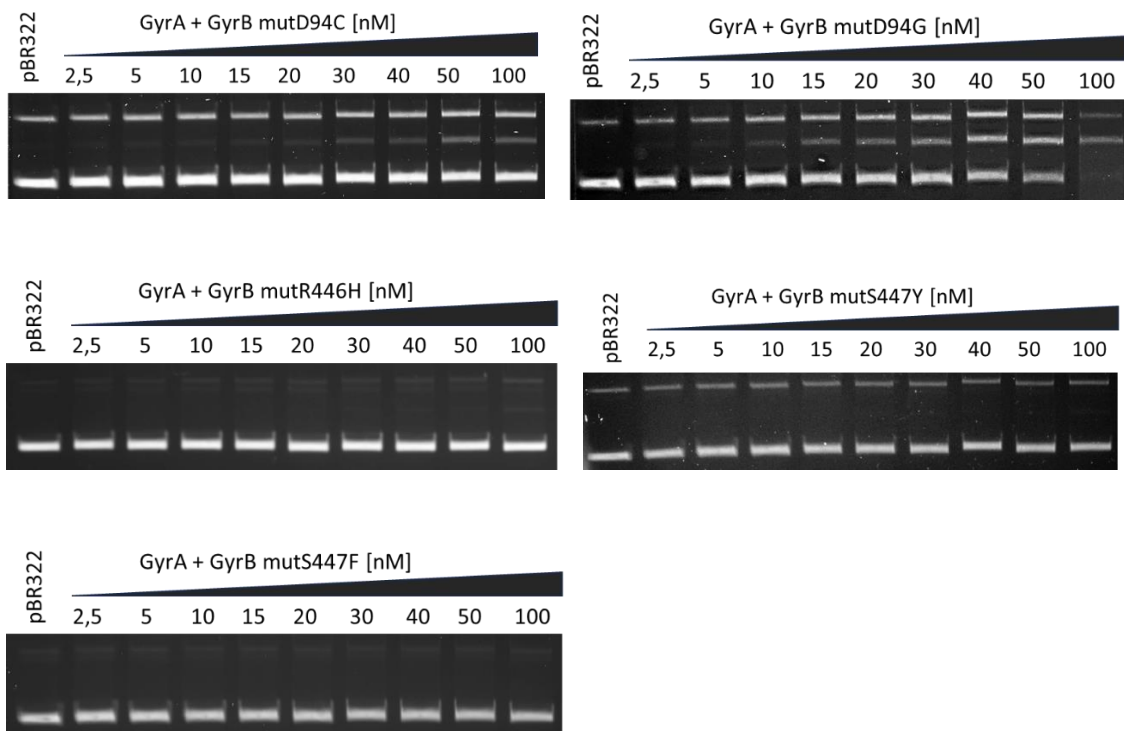




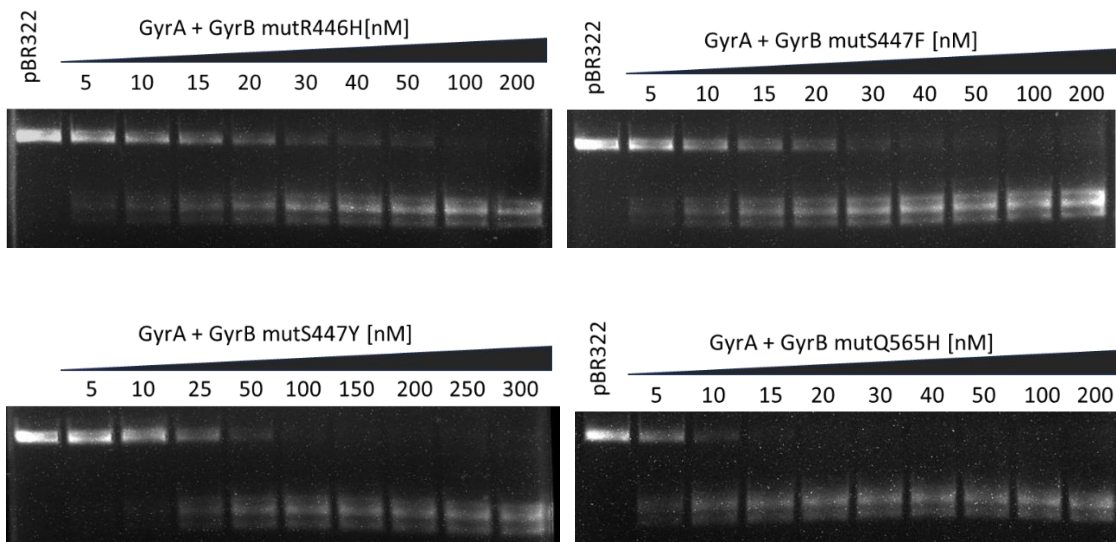
Rycina S2. Krzywe denaturacji termicznej białek GyrA oraz GyrB z substytucjami w kodonach potencjalnie związanych ze wzrostem lekooporności na fluorochinolony w odniesieniu do białek kontrolnych. Panel A to wykres zależności stosunku absorbancji 350/330 nm (Ratio) od temperatury. Panel B wskazuje na zmętnienie próbki (Turbidity), a panel C średnicę hydrodynamiczną cząstek przez rozproszenie światła (Cumulant Radius) wraz ze wzrostem temperatury.



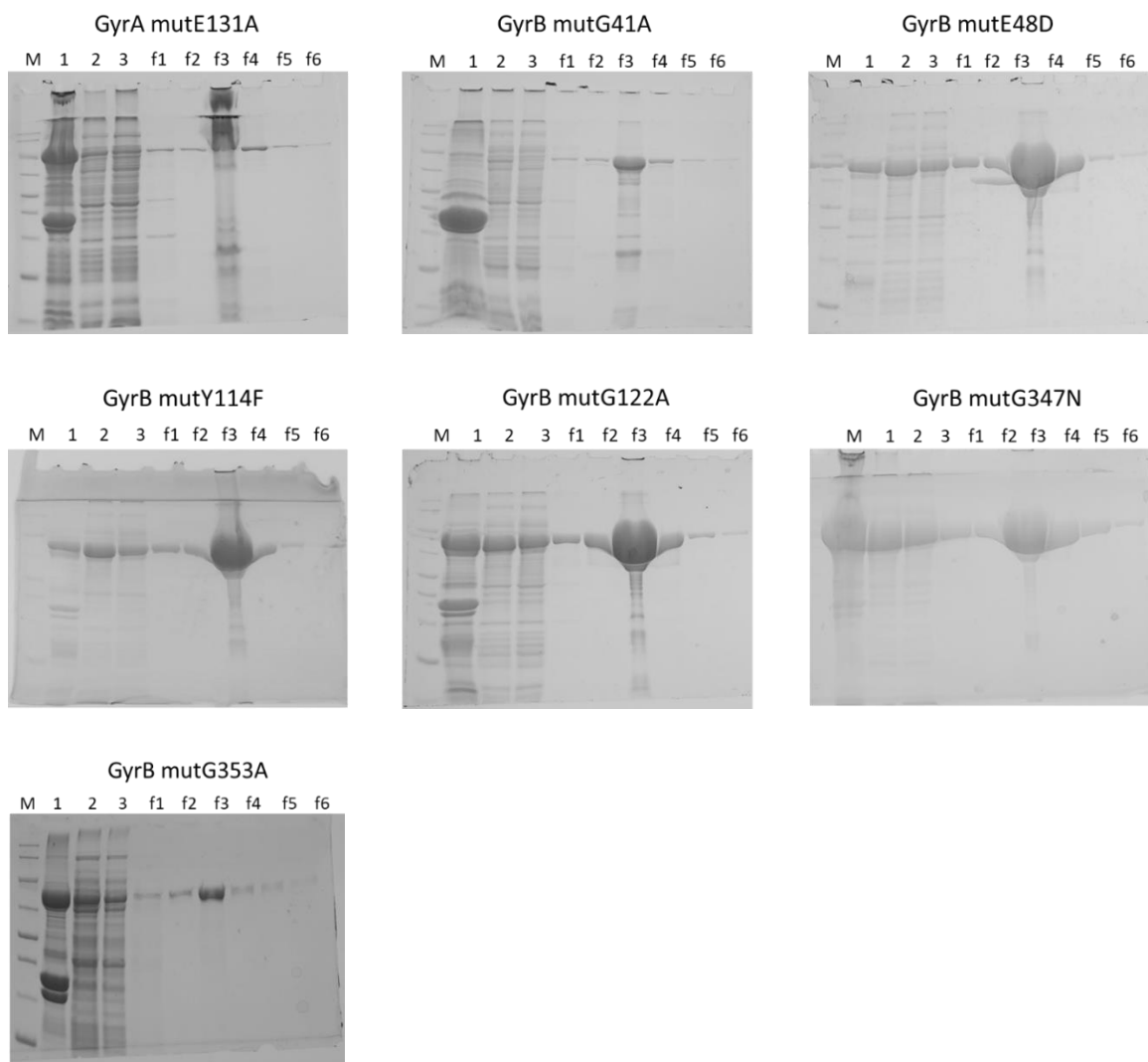
Rycina S3. Ocena jednej jednostki aktywności gyrazy DNA z substytucjami w kodonach pod doбором różnicującym na podstawie różnic w migracji form topologicznych plazmidowego DNA pBR322 w żelu agarozowym. PC – kontrola pozytywna, komercyjna gyraza DNA *M. tuberculosis*.



Rycina S4. Ocena aktywności białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach GyrA oraz GyrB w teście cięcia superskręconego DNA plazmidowego pBR322 na podstawie stosunku formy liniowej do całkowitej zawartości plazmidowego DNA w żelu agarozowym.



Rycina S5. Ocena dekatencji DNA z zastosowaniem białek rekombinowanych z substytucjami w kodonach 446, 447, 565 GyrB.



Rycina S6. Rozdział elektroforetyczny frakcji białek GyrA (92 kDa) i GyrB (74 kDa) z substytucjami w wybranych miejscach konserwatywnych (po oczyszczeniu metodą chromatografii metalopowinowactwa) w 12% żelu poliakrylamidowym. M – wzorec wielkości PageRuler, 1 – całkowita zawartość białka otrzymana po nadprodukcji, 2 – białka niezwiązane ze złożem agarozowym wysyconym jonami niklu, 3 – białka wymyte ze złoża podczas płukania, f1-f6 – kolejne frakcje białka po elucji ze złoża.

Tabela S1. Związki wybrane na podstawie dokowania molekularnego do kryształów gyrazy (6GAV, 5BTA) oraz modeli kryształów z substytucjami A90V i D94G warunkującymi oporność na fluorochinolony.

ZINC00076030	ZINC02750701	ZINC67674431	ZINC77485027	ZINC67758028
ZINC00283890	ZINC01143219	ZINC65384917	ZINC67869328	ZINC72159314
ZINC03152476	ZINC02685054	ZINC72138777	ZINC82138573	ZINC72419954
ZINC00290147	ZINC02859205	ZINC72144081	ZINC72473455	ZINC72430769
ZINC02490441	ZINC00612413	ZINC55154263	ZINC77489441	ZINC72433038
ZINC19536967	ZINC04802205	ZINC55154263	ZINC67894554	ZINC39445897
ZINC01230937	ZINC01059963	ZINC72150296	ZINC67895242	ZINC59383362
ZINC00817568	ZINC01062434	ZINC77379953	ZINC12055146	ZINC77339169
ZINC12387615	ZINC17972454	ZINC77379953	ZINC20536239	ZINC95375292
ZINC00172215	ZINC02883152	ZINC67803757	ZINC14992839	ZINC39445897
ZINC02911895	ZINC04820801	ZINC55199877	ZINC72167160	ZINC55211256
ZINC02201770	ZINC02442256	ZINC97551338	ZINC72167160	ZINC72167159
ZINC02201770	ZINC20495065	ZINC97551338	ZINC77516344	ZINC01305382
ZINC36129161	ZINC20494619	ZINC67833947	ZINC65507474	ZINC04714730
ZINC19771761	ZINC01419224	ZINC12597007	ZINC67947698	ZINC00845916
ZINC00441782	ZINC03619555	ZINC12597007	ZINC92020504	ZINC59383362
ZINC01196784	ZINC03619552	ZINC91644225	ZINC72479185	ZINC77339169
ZINC00670526	ZINC40268032	ZINC82115779	ZINC15071857	ZINC05270568
ZINC04497803	ZINC38790857	ZINC12299908	ZINC15071857	ZINC14883644
ZINC02293341	ZINC02324877	ZINC19595669	ZINC72171097	ZINC19872236
ZINC02688870	ZINC11873447	ZINC72163481	ZINC72480133	ZINC77343613
ZINC00172324	ZINC72423624	ZINC91657080	ZINC92061890	ZINC77344197
ZINC08671879	ZINC82092009	ZINC95517320	ZINC67982165	ZINC95503712
ZINC01173526	ZINC82092012	ZINC71752123	ZINC15076748	ZINC00847462
ZINC00376978	ZINC11998969	ZINC14981011	ZINC20866987	ZINC55385332
ZINC01167937	ZINC67514819	ZINC19800190	ZINC92096824	ZINC67515331
ZINC00670768	ZINC95499974	ZINC91745622	ZINC65535949	ZINC67755896
ZINC01778211	ZINC71730454	ZINC91793149	ZINC12094525	ZINC72144450
ZINC01163252	ZINC20450851	ZINC95522393	ZINC12448623	ZINC72150889

ZINC04147025	ZINC55074293	ZINC91829062	ZINC13596038	ZINC72164944
ZINC01163832	ZINC77321819	ZINC95522964	ZINC14883211	ZINC72419954
ZINC01165538	ZINC12208907	ZINC20271422	ZINC64066619	ZINC72463684
ZINC01305383	ZINC77340044	ZINC20271422	ZINC67755896	ZINC95528328

Tabela S2. Związki zakupione na podstawie identyfikacji przez dokowanie molekularne do kryształów gyrazy (6GAV, 5BTA) oraz modeli kryształów z substytucjami A90V i D94G warunkującymi oporność na fluorochinolony.

1-1A	<chem>Cl.C1.NCC1CCN(C1)C1CCCC1</chem>
1-2A	<chem>CSc1ccc(CNCc2ccc3OCOc3c2)cc1</chem>
1-4A	<chem>OC(CN1CCN(CC1)C=O)Cn1c2ccccc2c2ccccc12</chem>
1-5A	<chem>COc1ccc(Nc2nc(N)nc(CN3CCN(CC3)c3ccc(F)cc3)n2)cc1</chem>
1-6A	<chem>NC(=O)C(Cc1ccccc1)NC(=O)c1ccccc1SCc1ccc(F)cc1</chem>
1-7A	<chem>Cl.COc1cc(CNCC(O)c2ccccc2)cc(Cl)c1OCC(N)=O</chem>
1-8A	<chem>O=C(CC1N(Cc2cccc(Oc3ccccc3)c2)CCNC1=O)NCCN1CCCC1</chem>
1-11A	<chem>COc1ccc(CCN2C(=O)NC(C)(C3CCN(Cc4nc4-c4ccccc4)CC3)C2=O)cc1</chem>
1-12A	<chem>COc1ccc(CCN2CCCC(CN(C)Cc3nc3-c3ccccc3)C2)cc1</chem>
1-2B	<chem>Cl.OC(COc1ccccc1)Cn1c2ccccc2n(CCN2CCCC2)c1=N</chem>
1-3B	<chem>Cc1c(Cc2ccccc2)sc(NC(=O)CCc2ccccc2)c1C(N)=O</chem>
1-4B	<chem>Cc1ccc(NC(=O)CN2C(=O)S\C(=C/c3ccc(OCc4ccccc(F)c4)cc3)C2=O)cc1</chem>
1-5B	<chem>NC(=O)c1ccccc1NC(=O)CCSCCC(=O)Nc1ccccc1C(N)=O</chem>
1-6B	<chem>COc1ccc(cc1)C(=O)NC(CO)c1nnc(SCC(=O)Nc2ccccc(C)c2C)n1C</chem>
1-8B	<chem>COc1cc(CNCCc2ccccc(C)n2)ccc1OCC(O)CN1CCC(O)CC1</chem>
1-12B	<chem>COc1ccccc1CCNCc1ccc(OCC(O)CN2CCC(O)CC2)c(OC)c1</chem>
1-2C	<chem>COc1cc(\C=c2\sc3nc4ccccc4n3c2=O)ccc1OCc1nnn1</chem>
1-3C	<chem>OCCn1c(cn2c1nc1ccccc21)-c1ccc(cc1)-c1ccccc1</chem>
1-4C	<chem>COc1ccc(CC(=O)Nc2sc(Cc3ccccc3)c(C)c2C(N)=O)cc1</chem>
1-5C	<chem>NC(=O)c1c(NC(=O)c2ccc(o2)-c2cc(Cl)ccc2Cl)sc2CCCc12</chem>
1-10C	<chem>Cc1enc(CNC2CCc3c(C2)sc2nnc(Cc4ccccc4)C(F)(F)F)c(=O)c32)cn1</chem>
1-2D	<chem>Oc1cc2ccccc2cc1C(=O)NCCNC(=O)c1cc2ccccc2cc1O</chem>
1-3D	<chem>OCCCN1C(=O)c2ccc(Oc3ccc(Oc4ccc5C(=O)N(CCCO)C(=O)c5c4)cc3)cc2C1=O</chem>

1-4D	<chem>COc1ccc(OCCCC(=O)Nc2ccccc2C(N)=O)cc1</chem>
1-6D	<chem>CC(Oc1ccc(C)cc1)C(=O)Nc1sc(Cc2ccccc2)c(C)c1C(N)=O</chem>
1-7D	<chem>Nc1nc(CN2CCN(CC2)c2ccccc2)nc(n1)N1CCCCC1</chem>
1-11D	<chem>COc1cccc(CNCc2ccc(OC)c(OCC(O)CN(C)Cc3ccccc3)c2)c1</chem>
1-1E	<chem>COc1ccc(Cc2nnn2)cc1OC</chem>
1-2E	<chem>Cl.CCOc1ccc(cc1)C(O)Cn1c2ccccc2n(CCN2CCCCC2)c1=N</chem>
1-3E	<chem>O=C(CC1SC(=O)NC1=O)Nc1ccc(NC(=O)CC2SC(=O)NC2=O)cc1</chem>
1-5E	<chem>CC(C)(O)C#Cc1ccc(s1)C(=O)NCCNC(=O)c1ccc(s1)C#CC(C)(C)O</chem>
1-6E	<chem>COc1ccc(NC(=O)C2CC(=O)NC3=C2C(=O)CC(C3)c2ccc(OC)cc2)cc1</chem>
1-7E	<chem>Nc1nc(CN2CCN(CC2)c2ccccc2)nc(n1)N1CCOCC1</chem>
1-11E	<chem>COc1cccc(CNCc2ccc(OC)cc2OCC(O)CN2CCN(C)CC2)c1</chem>
1-1F	<chem>COc1ccccc1N1C(=O)CC(N2CCN(Cc3ccc4OCOc4c3)CC2)C1=O</chem>
1-2F	<chem>Cl.COc1ccc(cc1)C(O)Cn1c2ccccc2n(CCN2CCCCC2)c1=N</chem>
1-5F	<chem>Oc1ccc(Nc2nc(cs2)-c2ccc(O)cc2)cc1</chem>
1-6F	<chem>COc1ccc(cc1)N1CCN(Cc2nc(N)nc(n2)N2CCc3ccccc23)CC1</chem>
1-12F	<chem>COc1cc(CNCCn2ccnc2C)ccc1OCC(O)CN1CCOCC1</chem>
1-1G	<chem>NN1C(=S)S\C(=C\c2ccc(Cl)cc2)C1=O</chem>
1-2G	<chem>Oc1ccc(\C=N\N2CCN(Cc3ccc(Cl)cc3)CC2)c(O)c1</chem>
1-3G	<chem>COC(=O)C1=C(C)N\C(=C\c2ccc(CNC(=O)C(=O)Nc3ccc(C)c(C)c3)o2)C1=O</chem>
1-4G	<chem>COc1cc(\C=C2\NC(=O)N(C2=O)c2ccccc2)cc(Br)c1OCc1ccc(C)cc1</chem>
1-6G	<chem>NC(=O)c1ccccc1NC(=O)CN1CCN(Cc2ccccc2Cl)CC1</chem>
1-7G	<chem>CN(C)c1ccc(Nc2cc(C)nc3c(cnn23)-c2ccc(Cl)cc2)cc1</chem>
1-9G	<chem>CC(C)(O)CCc1cccc(c1)C(=O)NCCCN1CCNC(=O)C1</chem>
1-10G	<chem>CCC1(NC(=O)N(CC2COc3ccccc3O2)C1=O)C1CCN(Cc2cccc(O)c2)CC1</chem>
1-2H	<chem>Cc1ccc(o1)-c1nn(cc1\C=C1\NC(=S)N(C1=O)c1ccccc1)-c1ccccc1</chem>
1-3H	<chem>c1c(nc2c3ccccc3cn12)-c1ccc(cc1)-c1ccccc1</chem>
1-4H	<chem>Cc1ccc2nc(sc2c1)-c1ccc(NC2=CC(=O)CC(C2)c2ccc(O)cc2)cc1</chem>
1-5H	<chem>CC(Oc1ccc(cc1)-c1ccccc1)C(=O)NCc1ccc2OCOc2c1</chem>
1-6H	<chem>NC(=O)c1ccccc1NC(=O)CN1CCN(Cc2ccc3OCOc3c2)CC1</chem>
1-7H	<chem>O=C(CC1N(Cc2ccc(cc2)-c2ccccc2)CCNC1=O)NCCN1CCCC1</chem>
2-1B	<chem>Cc1ccccc1-n1cc(CNC(=O)CC2N(Cc3ccccc3F)CCNC2=O)cn1</chem>
2-10B	<chem>NC(=O)Cn1ccnc1C1CCCN(Cc2cc(=O)n3ccccc3n2)C1</chem>
2-11B	<chem>OC(CNC(=O)c1ccc2nc(cn2c1)-c1ccccc1)c1ccc(O)cc1</chem>

2-12B	<chem>COc1cc(CN2CCC(CC2)C#N)ccc1OCC(O)CN1CCC(O)CC1</chem>
2-11C	<chem>O=C(CCc1cc2CNCCn2n1)NCCc1nc(no1)-c1cccnc1</chem>
2-3D	<chem>Cl.Cl.C1CC2(CN1C1CCN(CC1)c1ccc3OCOe3e1)CCNCC2</chem>
2-8D	<chem>Cl.Cl.Cc1cnccc1N1CCCN(Cc2ccc(CCN)cc2)CC1</chem>
2-2E	<chem>C1CC2(CCN1)CCC(CC2)NC1CCN(CC1)C1CCOCC1</chem>
2-6F	<chem>Cc1enccc1N1CCCN(Cc2ccc(s2)C#CC(C)(C)O)CC1</chem>
2-8F	<chem>NC(=O)Cc1cccc(NC(=O)NCCN2CCCC(CO)C2)c1</chem>
2-9F	<chem>Cl.Cl.Oc1cc(cc2CN(CC3CCNC3)CCOc12)-c1cccc(Cl)c1</chem>
2-7G	<chem>CCCCc1nn(CC(=O)N2CCC(O)(C2)c2ccccc2C)c(=O)n1CC</chem>
2-3H	<chem>Cc1nccn1CCCN1CCCC(Cl)c1nccn1Cc1cccc1</chem>
2-8H	<chem>Cl.Cl.NC(=O)c1cccnc1N1CCN(CC1)C(=O)C1CC2(CN1)CCNCC2</chem>
2-9H	<chem>CCCCc1nn(CC(=O)N2CCNC(C2)c2ccccc2)c(=O)n1CC</chem>
2-10H	<chem>CN1CCC(CC1)NCCC1CN(CCO1)c1enn(C)c(=O)c1</chem>
3-1B	<chem>OC(COe1cccc(CN2CC(C2)c2cccn2)c1)CN1CCC(O)CC1</chem>
3-1C	<chem>NC(=O)C1CCCN(CCNC(=O)c2cn(Cc3ccccc3F)nn2)C1</chem>
3-2C	<chem>COc1ccc(O)c(CN2CCC(CC2)C(=O)Nc2ccc(cc2)-c2cccc(C)c2)c1</chem>
3-1E	<chem>CC(C)(O)CCc1ccc(cc1)C(=O)NCCN1CCCC(Cl)C(N)=O</chem>
3-1F	<chem>CC(C)(O)CCc1ccc(CN2CCN(CC2)c2ccncc2)cc1</chem>

Tabela S3. Związki wybrane na podstawie dokowania molekularnego do konserwatywnych miejsc GyrB, kieszeni ATPazowej oraz przez przegląd literaturowy. Zakupione związki zostały oznaczone według schematu 0-(A-H)00, a związki, które nie zostały zakupione 1-78.

numer związku	SMILES	identyfikacja
1-A01	<chem>C1(C(C)=CC2=C(C=1O)C(=C(C(O)=C2C(C)C)O)C=NCCOC1=CC=CC2C=CC=NC1=2)C1C(C)=CC2=C(C=1O)C(=C(C(O)=C2C(C)C)O)C=NCCOC1=CC=C2C=CC=NC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A02	<chem>S(=O)(=O)(C1=CC=C(C=C1)OCC(O)CN1CCN(CC1)C1C2C=CC=CC=2C2C=CC=CC1=2)C1=CC=C(C=C1)OCC(O)CN1CCN(CC1)C1C2C=CC=CC=2C2C=C C=CC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-A03	<chem>C1(=C(C)C=C2C(C(C=NCCOC3=CC=CC=C3F)=C(C(O)=C2C(C)C)O)=C1O)C1=C(C)C=C2C(C(C=NCCOC3=CC=CC=3F)=C(C(O)=C2C(C)C)O)=C1O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A04	<chem>C1(SCC(=O)NC2C=CC(=CC=2)C(N)=O)NC2=C(C=CC=C2)N=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A05	<chem>C1(NC(CSC2NC3C(=CC(=CC=3)OCC)N=2)=O)SC2=C(C=CC(OC)=C2)N=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A06	<chem>C1(NC(CSC2NC3C(=CC(=CC=3)OCC)N=2)=O)SC2=C(C=CC(OCC)=C2)N=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A07	<chem>C1(C(C)N)C=CC(=CC=1)C(C)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A08	<chem>N1(C2C=CC=C(OC)C=2)C(=O)C(CC1=O)NCCC1=CNC2C=CC(OC)=CC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A09	<chem>C1(NC(=O)C(NC(=O)C2C=CC=CC=2)=CC2C=CC3N(CC)C4C=CC=CC=4C=3C=2)=CC=CC(=C1)SC1C(C(=O)N(C2C=CC(Br)=CC=2)C1=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-A10	<chem>N1(CC(O)CN2CCN(CC2)CC(O)CN2C3C=CC=CC=3C3C=CC=CC2=3)C2C=CC=CC=2C2C=CC=CC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B01	<chem>C1(=C(C)C=C2C(C(C=NCCOC3=CC(C)=C(C(C)=C3Cl)Cl)=C(C(O)=C2C(C)C)O)=C1O)C1=C(C)C=C2C(C(C=NCCOC3=CC(C)=C(C(C)=C3Cl)Cl)=C(C(O)=C2C(C)C)O)=C1O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B02	<chem>N1(C)C2=CC=CC=C2C(NC(C)C1=O)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B04	<chem>C12C(N)=CC=C(O)C=1C(C1C(=CC=C(O)C=1C2=O)N)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B05	<chem>CC(C1=CC(C)=C(F)C=C1)N</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-B06	<chem>[C@@H](N)(C1=CC=C(F)C=C1F)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B07	<chem>C1(=CC(=CC=C1OC)CN[C@H]1CC[C@@H](CC1)O)OCC(O)CN(C)CC1C=CC=CC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B08	<chem>C1(=NC=NC(CC)=C1)N1CCN(CC1)CC1(CNCC1)O.C1.C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B09	<chem>N1(CCCCC1=O)CCNCC1=CC=CC(=C1)OCC(O)CN1CCC2C(=CC=CC=2)C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-B10	<chem>C1(C(=O)N2CCCC2)=C(CNCC2CCN(CC2)CCO)N2C(C=CC=C2)=N1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C01	<chem>C1([C@H]2C[C@H](C2)N)=NN=C(CNCC2=CC3C(=CC=C(OC)C=3)N2)N1CC</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C02	<chem>C12CCN(CCC=1N=CN=C2NCCO)CCCC1=CC=CC=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C03	<chem>C1(CN2CCC(CC2)(O)CN2C=CN=C2)C2C=CC=CC=2N(CCC(N)=O)C=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C04	<chem>C1(=CC(=CC=C1OC)CN(CCO)CCO)OCC(O)CN(C)CC1=CC=CC=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C05	<chem>N1(C2C=CC=C(C)C=2)C(=O)C(CC1=O)NCCC1C2C=CC=CC=2NC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C06	<chem>C1(=CC(=CC=C1OC)CN(CC)CCO)OCC(O)CN(C)CC1=CC=CC=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C07	<chem>C1(N=C(C2C=CC(=CC=2)OC)C=C(C(F)(F)F)N=1)S(=O)(=O)CCC(=O)NC1C=CC=CC=1CC</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C08	<chem>N1(CC(=O)NC2C=CC(=CC=2)C(C)=O)C2=CC=CC=C2N=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C09	<chem>O=C1N(C2CNCCC2)CCC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-C10	<chem>C1(=CC(C)=CC(C)=C1OC)CN1C[C@@H]([C@H](CN2CCC(CC2)CO)C1)CO</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-D01	<chem>N1=CC2=C(C=CC=C2)N1CCCNCC1=CC=C(C(OC)=C1)OCC(O)CN(C)C(C)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D02	<chem>N1=C(NCCN2CCC3C(=CC=CC=3)C2)C=C(N=C1N)C1CC(C1)N</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D03	<chem>N1C(N)=NC(=CC=1N1CC[C@H](N)C1)C1CC(C1)N</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D04	<chem>N1(C[C@@H]([C@@H](N(C)C)C1)O)C(=O)C1=CC=C(C=C1)C1=CC=CC2=C(C=CN=C12)N</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D05	<chem>N1C(N)=NC(=CC=1N1CCC(CC1)N1CCC(CC1)O)C1CC(C1)N.Cl.Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D06	<chem>N1(CCCC1=O)CCCNCC1=CC(OC)=CC=C1OCC(O)CN1CCC(CC1)O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D07	<chem>N1=NC(=CN1[C@@H]1CN[C@H](C(NC)=O)C1)CNC(=O)NC1C(F)=CC=C(F)C=1.Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D08	<chem>N1(CCC2C(=CC=CC=2)C1)CC(O)COC1C=CC=C(CNCCN2CCOCC2)C=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D09	<chem>S1C(C)=CC=C1CNCC1C=CC(=CC=1)OCC(O)CN(C)CC1C=CC=CC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-D10	<chem>C1(=CC(=CC=C1OC)CN(C)C(C)C)OCC(O)CN(C)C1=CC=CC=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E01	<chem>N1C(CNC(=O)NCC2CCN(CC3=CC=CC=C3F)C2)=NNC1=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E02	<chem>C(=O)(C1=CC=CO1)N1CCN(CC1)CC1(CNCC1)O.Cl.Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E03	<chem>S1C(CNCC2=CC=C(C(OC)=C2)OCC(O)CN2CCC(C2)O)=CC=C1Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E04	<chem>C1(CC(=O)NCC(=O)NCC(=O)NC[C@H]2CC[C@@H](CC2)C(=O)N[C@@H](CSCC2=CC=CC=C2)C(NCCCC(O)=O)=O)C(=O)OC2C(=CC(=C(O)C=2)Cl)C=1C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-E06	<chem>N1(CC(CC1=O)N)C1=CC=CC=C1F</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E07	<chem>N1(C2C=CC3=C(OCCO3)C=2)C(=O)C(CC1=O)NC CC1C2C=CC=CC=2NC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E08	<chem>N1C(C)=C(N(O)C=1C1=CC=CC=C1)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-E10	<chem>C12C(N)=CC=C(O)C=1C(C1=CC=CC=C1C2=O)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F01	<chem>C1(COC(=O)NC(CC2N=CNC=2)C(=O)NC(CCC(=O) N)C(=O)N2CCCC2C(=O)O)C2C=CC=CC=2C2=CC= CC=C12</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F02	<chem>[I-].C1(C=CC(O)C)C=C[N+](C)=CC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F03	<chem>C1(OC)C=C(C=C(OC)C=1OC)C=NCCCN1CCN(CC CN=CC2C=C(C(OC)=C(OC)C=2)OC)CC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F04	<chem>C1(N=CC=CC=1)S(=O)CC#N</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F05	<chem>C12C(=O)N(C(=O)N(C)C=1N=CN2CC(O)CNCC1C= CC=CC=1)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F06	<chem>N1(C(=O)CC(N)C1)C1=CC=CC=C1.Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F07	<chem>CCC(C1=CC=C(F)C=C1)O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F08	<chem>OC1=CC(C(N2CCCC2)=O)=CC=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F09	<chem>OCC1C2=C(C=CC=C2)CCC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-F10	<chem>CC(C1=CC=C(Cl)C=C1)(N)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-G01	<chem>C(F)(F)(C(F)(F)C=NN=C(C)[C@@]1(O)CC(OC2CC([NH3+])C(C(C)O2)O)C2C(C(O)C3C(C(=O)C4=C(C=CC=C4OC)C3=O)C2O)C1)C(F)(F)C(F)(F)F.[Cl-]</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G02	<chem>C1(C(F)(F)F)C2CCCC=2N(CC(=O)NC2=CC=C(C=C2)C(C)=O)N=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G03	<chem>C12C(=CC=NC1=CC(Cl)=CC=2)NCCCN1CCN(CC1)CCCCCN1CCN(CC1)CCNC1=CC=NC2=CC(Cl)=CC=C12</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G04	<chem>C12=CC=C(C=C1N=CC=C2N1CCN(CC1)CCCN1CCN(CC1)CCCN1CCN(CC1)CCCN1CCN(CC1)C1=C=C=NC2=CC(Cl)=CC=C12)Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G06	<chem>OC/C=C/C1=CC(OC)=C(O)C=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G07	<chem>C(C1C=CC=CC=1)(C1C=CC=CC=1)N1CCN(CC(O)COC2C=CC(S(=O)(=O)C3C=CC(OCC(O)CN4CCN(C(C5=CC=CC=C5)C5=CC=CC=C5)CC4)=CC=3)=CC=2)CC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G08	<chem>C1(CN)CC(CC(CO)C1)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G09	<chem>C1(N(CC)N=CC=1NC(=O)C1C=CN(C(F)F)N=1)C(=O)NC1C=NN(C)C=1C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-G10	<chem>N(=O)(=O)C1C(C)=CC=C(C=1)C(=O)NC1=CC=CC=C1C(NCCCN1C=CN=C1)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H01	<chem>C12C3=CC=CC=C3CCC1=C(N=C(SCC(NCCCN1C=CN=C1)=O)N=2)C(F)(F)F</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H02	<chem>N1(C=NC2C(=NC=NC1=2)NC(C1=CC=CC=C1)=O)C1CC(C(CO)O1)OP(=O)(OC1=CC=C(C=C1)Cl)OCC1C(OP(OCCC#N)(=O)OC2=CC=C(C=C2)Cl)CC(O1)N1C=CC(=NC1=O)NC(C1=CC=CC=C1)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB

1-H03	<chem>N1(CC(O)CN(CCO)CCO)C2=CC=CC=C2C2C=CC=CC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H04	<chem>C(=O)(NC(CC(N)=O)C(=O)NC(CO)C(=O)NC(CC1C=CC(=CC=1)OCC1C=CC=CC=1)C(N)=O)C(C(C)O)NC(=O)OC(C)(C)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H05	<chem>N1(C)C(SCC(=O)N2CCN(CC2)C)=NN=C1CC(=O)NC1C=CC=CC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H06	<chem>C1(OC2=C(C=C(C=C2)CC)N=1)C1=CC(=CC=C1O)NC(COC1C=CC(=CC=1)N(=O)=O)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H07	<chem>N1(C2=CC=C(C=C2)CC)C(=O)C(CC1=O)NCCC1=CNC2C=CC(C)=CC1=2</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H08	<chem>N1(C2=CC=C(C=C2)C(C)=O)C(=O)C(CC1=O)NCCC1C2C=CC=CC=2NC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H09	<chem>N1(C2=CC(C)=CC(C)=C2)C(=O)C(CC1=O)NCCC1C2C=CC=CC=2NC=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
1-H10	<chem>N1(CCCN2C=CN=C2)C(=O)C2C(=CC(=CC=2)C(=O)C2=CC=CC(=C2)N(=O)=O)C1=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
2-A01	<chem>N1(CC)C2C=CC=CC=2C2C=CC(=CC1=2)NC(CSC1NC2=C(C=C(C=C2)Cl)N=1)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
2-A02	<chem>N1(C(C)C(=O)NNC(=S)NC2C=CC(=CC=2)Cl)N=C(C(N(=O)=O)=O)=C1C)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
2-A03	<chem>C1(C(F)(F)F)C=C(N(CCCNC(=O)C2=CC=C(COC3=C(F)C(F)=C(C(F)=C3F)F)O2)N=1)C1CC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
2-A04	<chem>N1(C(=O)C=CC(C2C=CC=CC=2)=N1)C(C)C(=O)NC1C=CC(=CC=1)C(C)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
2-A05	<chem>C1(N(C)C)NC2C(=C(N)N=CN=2)N=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB



5	<chem>[H]Cl.C(C1(N)CC2=C(C1)C=CC=C2)O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
6	<chem>CCC(C1=C(F)C(Cl)=CC=C1)O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
7	<chem>N1(CCCC(N)C1)C(C(C)C)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
8	<chem>N1(CCC2C(=CC=CC=2)C1)CC(O)COC1C=CC=C(CNCCC(N)=O)C=1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
9	<chem>N1=NC(=CN1[C@@H]1CN[C@H](C(NC)=O)C1)C1C=CC(=CC=1)CN1CC[C@@H](O)C1.Cl.Cl</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
10	<chem>N1(CCC2C(=CC=CC=2)C1)CC(O)COC1C=CC=C(C=1)CN1CCCCC1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
11	<chem>C(F)(F)(C1C=CC=CC=1)C(N)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
12	<chem>CC(N1C(=O)C(N)CC1)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
13	<chem>N1(CCC[C@@]1([H])C(=O)N[C@@]([H])(CC(C)C)C(=O)NCC(N)=O)C(=O)[C@@]([H])(CSCCC(=O)C(C)(C)C)NC(=O)[C@]([H])(NC(CNC(=O)[C@@]([H])(C(C)CC)NC(=O)OC(C)(C)C)=O)CC(N)=O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
14	<chem>C1(NC(CSC2=NC(C3=CC=CS3)=CC(=N2)C(F)(F)F)=O)SC(=C(CC)C=1C#N)C</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
15	<chem>CCC(C1=C(F)C=C(F)C=C1)O</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
16	<chem>CCC1=CC=C(C(N)(C)C)C=C1</chem>	wiązanie do kodonów 347, 353 GyrB
17	<chem>CCNC(=O)NC1=CN(C2=CC(=CN=C12)C1=CC=CN=C1)C1=NC(CCCO)=CC=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej

18	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=N3)N1CC[C@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
19	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=N3)N1CC[C@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
20	<chem>C[C@H](NC(=O)C1=CC=C(NC(=O)C2=C(C1)C(Cl)=C(C)N2)C(OCC[NH3+])=C1)C([O-])=O</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
21	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=N3)N1CC[C@@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
22	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=N3)N1CC[C@@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
23	<chem>CCNC(=O)NC1=CN2C(C=C(C=C2C2=NC=CC=N2)C2=CN=CN=C2)=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
24	<chem>CCNC(=O)NC1=CN(C2=CC(=CN=C12)C1=CC=CN=C1)C1=NC(CCCC([O-])=O)=C(C)C=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
25	<chem>CN1C2=C(C=CC1=O)C(=NN2)C1=CN=C(S1)C1=C=C=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
26	<chem>CCN1C2=C(C=C(C)C1=O)C(=NN2)C1=CN=C(S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
27	<chem>CCNC(=O)NC1=CN(C2=CC(=CN=C12)C1=CC=CN=C1)C1=NC(CCO)=CC=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
28	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(C3=CN=CN=C3)=C(OC)N=C2S1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
29	<chem>CCNC(=O)NC1=CC(C2=NC(=CS2)C(F)(F)F)=C(C=N1)C1=CN=CC(=C1)C1=NOC(=O)N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
30	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CO=C=N1)=N3)N1CC[C@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej

31	<chem>C=CCN1C2=C(C=CC1=O)C(=NN2)C1=CN=C(S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
32	<chem>CCNC(=O)NC1=CN(C2=CC(=C[NH+]=C12)C1=CC=CN=C1)C1=NC(CCCO)=CC=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
33	<chem>CCNC(=O)NC1=CN(C2=CC(=C[NH+]=C12)C1=CC=CN=C1)C1=NC(CCO)=CC=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
34	<chem>CCNC(=O)NC1=CC(C2=NC(=CS2)C(F)(F)F)=C(C=N1)C1=CN=CC(=C1)C(\N)=N\O</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
35	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CN=CC(OCC[NH+](C)C)=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
36	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=C(S1)N(C(C)C)C(=O)C(=C2)C1=CN2N=CN=C2C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
37	<chem>CCNC(=O)C1=CC2=C(N3C=CC(=N3)C(F)(F)F)C(=CN=C2N1)C1=CN=CC(=C1)C(=O)NC</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
38	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CN=CC(OCCN(C)C)=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
39	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(NC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
40	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(NC[C@@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
41	<chem>CCNC(=O)NC1=NC=C(C(=O)NC2=CC=CN=C2)C(NC2=CC=C(O)C=C2)=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
42	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=[NH+]3)N1CC[C@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
43	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CN=CC(OCCN(C)C)=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej

44	<chem>C[C@H](NC(=O)C1=CC=C(NC(=O)C2=C(Cl)C(Cl)=C(C)N2)C(OCC[NH3+])=C1)C1=NNC(=O)O1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
45	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=COC=N1)=[NH+]3)N1CC[C@@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
46	<chem>C[C@H](NC(=O)C1=CC=C(NC(=O)C2=C(Cl)C(Cl)=C(C)N2)C(OCCN)=C1)C([O-])=O</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
47	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=CN=CO1)=[NH+]3)N1CC[C@@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
48	<chem>CNC1=C2NC3=C(C2=CC(F)=C1)C(=NC(CNC(=O)C1=COC=N1)=[NH+]3)N1CC[C@H]([NH3+])C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
49	<chem>CCNC(=O)NC1=NC=C(C(=O)NC2=CC=CN=C2)C(NC2=CC=C(OC)C=C2OC)=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
50	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(CC[NH+](C)C)C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
51	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=C(S1)N(CC(F)F)C(=O)C(=C2)C1=CN=CC=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
52	<chem>CCNC(=O)NC1=CN2C(C=C(C=C2C2=NC=C(C)C=N2)C2=CC=CN=C2)=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
53	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(NC3CCOCC3)N=C2S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
54	<chem>CCNC(=O)NC1=CN2C(C=C(C=C2C2=NC=C(F)C=N2)C2=CC=CN=C2)=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
55	<chem>CCNC(=O)NC1=CN2C(C=C(C=C2C2=NC(=CC=N2)C(=O)OC)C2=CC=CN=C2)=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
56	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(CCN(C)C)C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej

57	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(CC[NH+](C)C)C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
58	<chem>CCCN1C2=C(C=CC1=O)C(=NN2)C1=CN=C(S1)C1=CC=C(N=C1)N(C)C</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
59	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(CCN(C)C)C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
60	<chem>CC(C)OC1=CC(=CC=C1NC(=O)C1=C(Cl)C(Cl)=C(C)N1)C(=O)N[C@@H](C)C1=NNC(=O)O1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
61	<chem>CCCC1=CC=CC2=C1NN=C2C1=CN=C(S1)C1=CC=C(CC([O-])=O)N=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
62	<chem>CCN1C2=C(C=CC1=O)C(=NN2)C1=CN=C(S1)C1=CC=CN=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
63	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=C(S1)N(C(C)C)C(=O)C(=C2)C1=CC2=NC=NN2C=C1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
64	<chem>CCNC(=O)NC1=CN2C(C=C(C=C2C2=NC=C(C)C=N2)C2=CC(=O)N(CC)C=C2)=N1</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
65	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(C)C(=C1)C(C)C</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
66	<chem>CCNC(=O)NC1=NC2=CC(=C(OC[C@H]3CCOC3)N=C2S1)C1=CC(=O)N(C)C(=C1)C(C)C</chem>	wiązanie do kieszeni ATPazowej
67	<chem>N#Cc1cncc(c1)c2nccs2</chem>	przegląd literaturowy
68	<chem>O=C(C1=NC=C(C2=NC=CS2)C=C1)OC</chem>	przegląd literaturowy
69	<chem>COC(=O)c1ccc(cn1)c2=nc=c(Br)s2</chem>	przegląd literaturowy
70	<chem>CCCc1cc2n(ncc2c(c1))C3CCOC(C3)</chem>	przegląd literaturowy
71	<chem>CCCc1cc2[nH]nc(I)c2c1</chem>	przegląd literaturowy
72	<chem>c1cc2n(nc([Sn](C)(C)C)c2c(c1)CCC)C3CCOC(C3)</chem>	przegląd literaturowy

73	<chem>O=C(O)c1cc(cn1)c2nc(c(s2)c3c4ccccc4[nH]c3)CCC</chem>	przegląd literaturowy
74	<chem>CCc1ncnc2n(cn(c12)S3c4ncccc4n3)N5CCC[C@H](N)C5</chem>	przegląd literaturowy
75	<chem>C1CN(C[C@H]1N)C2=NC(=NC3=C2C4=CC=CC=C4N3)SC5=CC6=NC=CN=C6N=C5</chem>	przegląd literaturowy
76	<chem>CC1=NC=C(C=N1)OC2=NC3=C(C4=C(N3)C(=CC(=C4)F)NC)C(=N2)N5C[C@H]6CCN[C@H]6C5</chem>	przegląd literaturowy
77	<chem>CC1=NC=C(C=N1)OC2=NC3=C(C4=C(N3)C(=CC(=C4)F)NC)C(=N2)N5C[C@@H]6[C@@H](C[C@@]6(C5)C)N</chem>	przegląd literaturowy
1-E05	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=NC=C(S2)C3=CC=NN3</chem>	przegląd literaturowy
78	<chem>CN1C=CC(=N1)C2=CN=CS2</chem>	przegląd literaturowy

Tabela S4. Związki wybrane na podstawie wytrenowanego modelu sztucznej inteligencji. Zakupiono związki o numerach 1-8.

numer związku	SMILES	IC <sub>50</sub> [nM]	Wartość predykcji regresra
1	<chem>CCOC(=O)c1cnc2ccc(OC)cc2c1Nc1ccc(N2CCN(C)CC2)cc1</chem>	<50000	0,75
2	<chem>COc1ccc(NC(=O)N2CCN(c3nsc4ccccc34)CC2)c(OC)c1</chem>	<20000	0,5
3	<chem>O=C(CCC(=O)N1CCN(c2nsc3ccccc23)CC1)Nc1ccccc1</chem>	<50000	0,75
4	<chem>COc1ccc(NC(=O)CCC(=O)N2CCN(c3nsc4ccccc34)CC2)cc1</chem>	<20000	0,5
5	<chem>O=C(CCC(=O)N1CCN(c2nsc3ccccc23)CC1)NCc1ccccc1</chem>	<50000	0,75

6	<chem>CO[C@@H]1[C@@H](O)[C@@H](O)[C@H](O)c2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
7	<chem>COc1cc(NC(=O)N2CCN(c3nsc4cccc34)CC2)cc(OC)c1OC</chem>	<20000	0,5
8	<chem>Cc1cc(C)nc(CNC(=O)N2CCN(c3nsc4cccc34)C2)n1</chem>	<20000	0,5
9	<chem>COc1ccc2nc(C)nc(N3CCC(NC(=O)Nc4ccc(F)cc4)CC3)c2c1</chem>	<50000	0,75
10	<chem>COC(=O)c1cc2cc(NC(=O)N3CCCN(c4ccc(OC)c4)CC3)ccc2o1</chem>	<50000	0,75
11	<chem>COc1ccc2nc(C)nc(N3CCC(NC(=O)Nc4cccc4)C3)c2c1</chem>	<50000	0,75
12	<chem>Cc1cc(C(=O)N2CCC(NC(=O)Nc3ccc(F)cc3)CC2)c2cccc2n1</chem>	<50000	0,75
13	<chem>COc1ccc2nc(C)cc(N3CCC(C(=O)Nc4cccc4)CC3)c2c1</chem>	<50000	0,75
14	<chem>COc1ccc2nc(C)cc(C(=O)N3CC[C@H](NC(=O)Nc4ccc(F)cc4)C3)c2c1</chem>	<50000	0,75
15	<chem>COc1ccc2nc(C)cc(C(=O)N3CC[C@@H](NC(=O)Nc4ccc(F)cc4)C3)c2c1</chem>	<50000	0,75
16	<chem>COc1ccc2nc(C)nc(N3CC[C@@H](NC(=O)Nc4ccc(F)cc4)C3)c2c1</chem>	<50000	0,75
17	<chem>COc1ccc2nc(C)nc(N3CC[C@H](NC(=O)Nc4ccc(F)cc4)C3)c2c1</chem>	<50000	0,75
18	<chem>COc1ccc2nc(C)cc(C(=O)N3CCC(NC(=O)Nc4ccc4)CC3)c2c1</chem>	<50000	0,75
19	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(N)=O)[C@H](O)[C@@H](Oe2ccc3c(=O)[c-](NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
20	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(N)=O)[C@@H](O)[C@@H](Oe2ccc3c(=O)[c-</chem>	<20000	0,5

	<chem>](NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>		
21	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(N)=O)[C@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(=O)[c-](NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
22	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(N)=O)[C@@H](O)[C@@H](Oc2ccc3c(=O)[c-](NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
23	<chem>CO[C@@H]1[C@@H](OC(=O)c2ccc(C)[nH]2)[C@@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2Cl)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
24	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(=O)c2ccc(C)[nH]2)[C@@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2Cl)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
25	<chem>CO[C@@H]1[C@H](OC(=O)c2ccc(C)[nH]2)[C@@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2Cl)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
26	<chem>CO[C@@H]1[C@@H](OC(=O)c2ccc(C)[nH]2)[C@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2Cl)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
27	<chem>CO[C@]1(C)[C@H](OC(=N)O)[C@@H](O)[C@@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
28	<chem>CO[C@]1(C)[C@H](OC(=N)O)[C@@H](O)[C@@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
29	<chem>CO[C@]1(C)[C@H](OC(=N)O)[C@H](O)[C@@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5

30	<chem>CO[C@]1(C)[C@H](OC(=N)O)[C@H](O)[C@H](Oc2ccc3c(O)c(NC(=O)c4ccc(O)c(CC=C(C)C)c4)c(=O)oc3c2C)OC1(C)C</chem>	<20000	0,5
31	<chem>COC(=O)c1cc2cc(NC(=O)N3CCN(c4ccc([N+](=O)[O-])cc4)CC3)ccc2o1</chem>	<50000	0,75
32	<chem>COc1ccc(OC)c(NC(=O)N2CCN(c3nsc4ccccc34)CC2)c1</chem>	<20000	0,5