

Received: 2012.06.22
Accepted: 2012.12.19
Published: 2013.03.04

Bakteryjne topoizomerazy typu I – rola biologiczna i zastosowanie jako potencjalnych celów dla antybiotyków*

Bacterial type I topoisomerases – biological function and potential use as targets for antibiotic treatments

Marcin Szafran¹, Jolanta Zakrzewska-Czerwińska^{1,2}, Dagmara Jakimowicz^{1,2}

¹ Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

W komórce bakteryjnej chromosom występuje w postaci niezależnych topologicznie domen, których przestrzenna organizacja kontrolowana jest przez białka zwane topoizomerazami. Prawidłowa topologia chromosomu jest jednym z elementów warunkujących zachodzenie podstawowych procesów, takich jak replikacja, transkrypcja oraz rekombinacja materiału genetycznego. Dodatkowo, najnowsze badania wskazują na istotną rolę topologii chromosomu w przystosowaniu bakterii do zmieniających się warunków środowiskowych, a w przypadku szczepów patogennych jej związku z wirulencją. W ostatnich latach obserwuje się wzrost doniesień o pojawianiu się patogennych gatunków bakterii opornych na stosowane antybiotyki. Z tego względu poszukiwanie nowych leków wydaje się sprawą priorytetową w walce z patogenami. W pracy omówiono aktualny stan wiedzy na temat bakteryjnych topoizomeraz typu IA oraz ich potencjalne zastosowanie jako celów dla nowych związków antybakteryjnych.

Słowa kluczowe:

topoizomerazy IA • antybiotyki • topologia chromosomu • regulacja ekspresji genów

Summary

The bacterial chromosome is composed of topologically independent domains, whose spatial organization is controlled by enzymes called topoisomerases. Topology maintenance is crucial in many important cellular processes such as replication, transcription and recombination. Moreover, the role of chromosome topology in adaptation of bacteria to environmental changes and, in the case of pathogenic strains, in their virulence was described. In recent years higher numbers of pathogenic strains resistant to antibiotic treatment have been noticed. In this paper we present the current state of knowledge about the structure and cellular functions of bacterial topoisomerases IA. In particular, we discuss the potential use of these enzymes as new targets for antibacterial compounds.

Keywords:

topoisomerases IA • antibiotics • chromosome topology • regulation of gene expression

* Praca finansowana przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, program POMOST (POMOST/2010-2/5), ze środków PO IG Unii Europejskiej.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1038352>

Word count: 4615
Tables: 2
Figures: 3
References: 95

Adres autora: Marcin Szafran, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, ul. Tamka 2, 50-137 Wrocław;
 e-mail: marcin.szafran@uni.wroc.pl

WSTĘP

Znaczny rozwój technik mikroskopowych i analitycznych w ostatnich latach pozwolił na śledzenie dynamiki chromosomów u wielu bakterii w trakcie ich cyklu życiowego. Wykazano, że chromosom bakteryjny nie jest strukturą bezwładnie zawieszoną w cytoplazmie, lecz jego organizacja podlega precyzyjnej kontroli na różnych etapach rozwoju komórki. W organizację struktury chromosomu bakteryjnego zaangażowanych jest wiele białek począwszy od małych, zasadowych białek podobnych do eukariotycznych histonów, a kończąc na grupie enzymów, zwanych topozomerazami, kontrolujących topologię chromosomu. Topologia chromosomu jest niezwykle istotna dla prawidłowego funkcjonowania komórki i wpływa na ekspresję wielu genów zależnych od stopnia superskręcenia DNA. Intensywne badania nad bakteryjnymi topozomerazami, począwszy od lat 70 ub.w., kiedy po raz pierwszy zidentyfikowano te enzymy [86], dostarczyły wielu informacji na temat ich roli komórkowej. Ze względu na mnogość opisanych funkcji, pełnionych przez topozomerazy w komórce bakteryjnej oraz brak podobieństwa względem ich eukariotycznych homologów, enzymy te wydają się doskonałym celem w terapiach przeciwbakteryjnych.

STRUKTURA BAKTERYJNEGO CHROMOSOMU

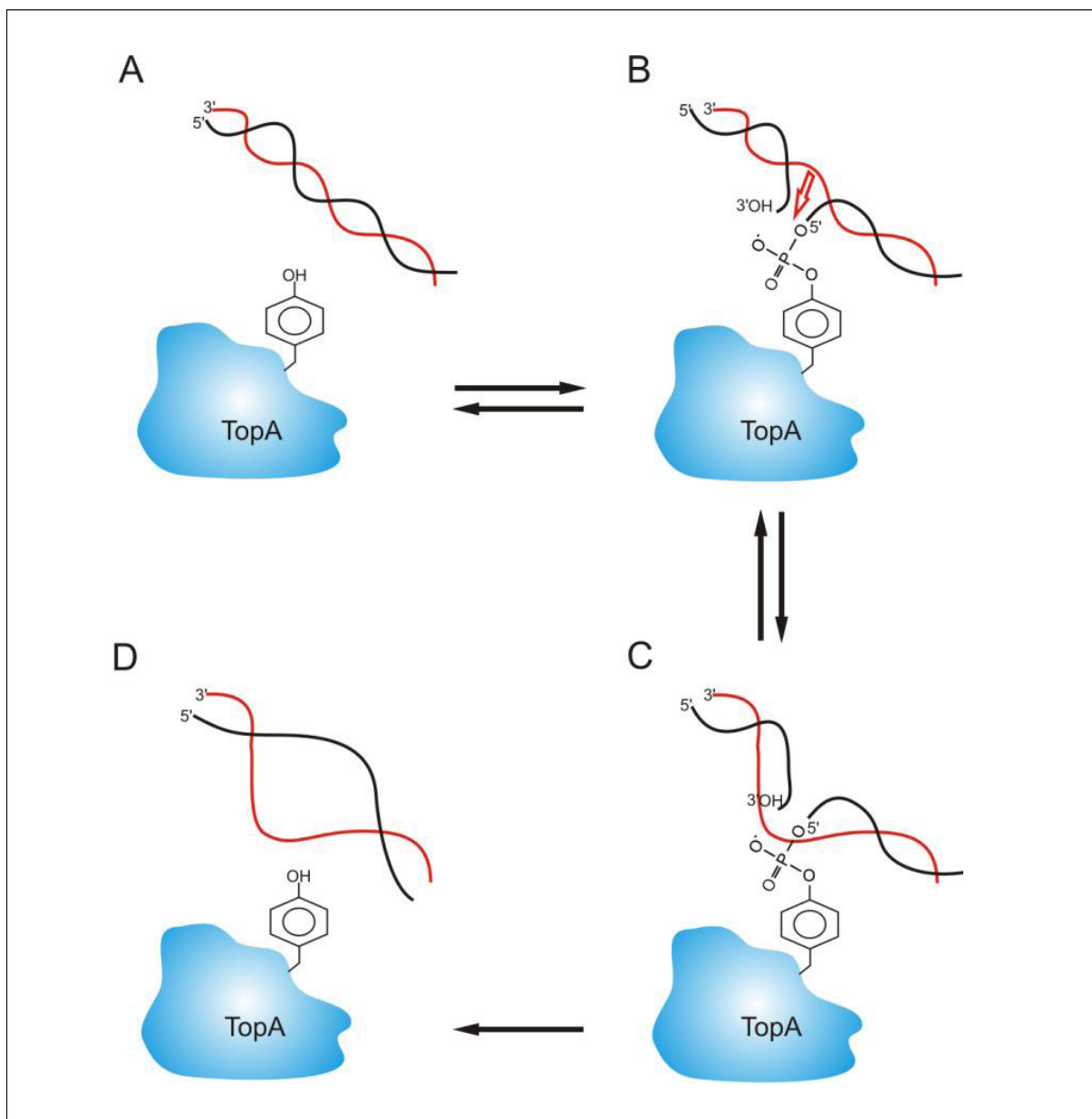
Typowy chromosom bakteryjny jest pojedynczą, kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką dwuniciowego DNA. Oprócz bakterii mających pojedynczy chromosom w postaci kolistej, istnieją również mikroorganizmy, u których chromosom występuje w postaci liniowej cząsteczki (*Streptomyces coelicolor* [42], *Borrelia burgdorferii* [26]) lub może być więcej niż jeden chromosom (*Vibrio cholerae* [82], *Agrobacterium* [2]). Chromosom(y) w komórce bakteryjnej występuje/ją w postaci nukleoidu, czyli DNA związanego z białkami oraz RNA, zanurzonego w cytoplazmie komórki bakteryjnej i nieoddzielonego żadną barierą od jej pozostałych składników. Nukleoid zajmuje około 10-15% objętości komórki i stanowi u bakterii odpowiednik jądra komórkowego. Chromosom bakteryjny, niezależnie od postaci w jakiej występuje, musi przyjąć strukturę umożliwiającą jego upakowanie wewnątrz komórki. DNA modelowego szczepu *Escherichia coli* K12 MG1655, o długości w przy-

bliżeniu wynoszącej 1600 μm , zbudowany jest z 4,6 Mbp i musi ulec przynajmniej 1000-krotnemu skondensowaniu [54,95], aby móc się zmieścić w komórce bakteryjnej, której długość wynosi $\sim 2,0\text{-}3,0 \mu\text{m}$, a szerokość $\sim 0,5\text{-}1,0 \mu\text{m}$. Jednocześnie, pomimo znacznego upakowania, nukleoid musi być dostępny dla licznych białek zaangażowanych w takie procesy, jak replikacja, transkrypcja, rekombinacja oraz segregacja materiału genetycznego, które obejmując rozległe obszary chromosomu, również wpływają na jego topologię. U bakterii, zwłaszcza tych szybko się dzielących, procesy te zachodzą często jednocześnie, przez co chromosom staje się cząsteczką niezwykle dynamiczną i podlegającą ciągłym, przestrzennym rearanżacjom. Wiele analiz mikroskopowych przeprowadzonych w ostatnich latach wykazało, że chromosom bakteryjny jest strukturą wysoce zorganizowaną. Uważa się, że na organizację DNA w komórce wpływa już sama sekwencja nukleotydowa, promująca tworzenie się określonych struktur przestrzennych, takich jak zgięcia i pętle [52,74]. Dodatkowo upakowanie chromosomu wewnątrz komórki wspomagane jest przez liczne, zasadowe białka, tzw. NAPs (nucleoid associated proteins) oraz RNA [95]. Ekspresja tych makrocząstek podlega precyzyjnej kontroli i zmienia się na różnych etapach wzrostu komórki bakteryjnej [6]. Ich rolę opisano w wielu pracach przeglądowych dotyczących struktury i dynamiki chromosomu [15,43,48,49]. Wykazano, że duża rolę w upakowaniu cząsteczki DNA pełni wprowadzanie negatywnych superskrętów w jej obrębie. Negatywnie superskręcony DNA w komórce *E. coli* występuje w postaci kilkuset domen, z których każda ma wielkość około 10 kbp. Poszczególne domeny są topologicznie niezależne od siebie, stąd uszkodzenie nici DNA prowadzi tylko do lokalnej relaksacji chromosomu, nie obejmując swoim działaniem całej cząsteczki [63,75]. Uzyskane przez Deliusa i Worcela [17] techniką mikroskopii elektronowej zdjęcia chromosomu *E. coli* sugerowały początkowo model, w którym chromosom byłby spięty przez zasadowe białka strukturalne, tworzące rdzeń i nadające DNA kształt rozety. Obecnie uważa się, że poszczególne domeny są kotwiczone po wewnętrznej stronie błony komórkowej [23,39,72]. Gwałtowna liza ściany komórkowej prowadzi do asocjacji białek kotwiczących DNA, nadając mu charakterystyczny

kształt rozety obserwowany *in vitro* przez Deliusa i Worcela [17]. Przypuszcza się, że lokalizacja domen jest dynamiczna i podlega czasowym zmianom przestrzennym. Jednak rozmieszczenie poszczególnych domen na konkretnych etapach cyklu komórkowego wydaje się stałe i precyzyjnie kontrolowane przez komórkę bakteryjną [25].

W kontrolowanie superskręcenia DNA zaangażowane są białka zwane topoizomerazami. Enzymy te katalizują reakcję nacięcia, przemieszczenia nici DNA oraz religacji wiązania fosfodiesterowego. Różny mechanizm działania to-

poizomeraz stał się podstawowym kryterium ich podziału na dwa typy - I oraz II, które nacinają odpowiednio jedną lub dwie nici DNA (ryc. 1). Obie grupy topoizomeraz wykazują brak podobieństwa zarówno na poziomie sekwencji aminokwasowej, jak również struktury przestrzennej, sugerując tym samym ich odmienne pochodzenie ewolucyjne. Bakteryjne topoizomerazy typu I są monomerami, natomiast topoizomerazy typu II działają w komórce jako heterotetramery. W obrębie każdej z grup, na podstawie różnic w mechanizmie działania oraz homologii białek względem siebie wyróżnia się dodatkowe podtypy.



Ryc. 1. Mechanizm działania topoizomerazy typu IA. Topoizomeraza IA rozpoznaje i wiąże DNA (A). W efekcie nukleofilowego ataku grupy hydroksylowej reszty tyrozyny w centrum katalitycznym topoizomerazy na wiązanie fosfodiesterowe dochodzi do jego hydrolizy (wiązania fosfodiesterowego) z jednoczesnym utworzeniem przejściowego kompleksu kowalencyjnego między grupą hydroksylową tyrozyny, a uwolnioną grupą fosforanową na 5'-końcu przeciętej nici (B). Następnie nietknięta nić jest przeciągana przez utworzone pęknięcie (C). Pełen cykl katalityczny kończy się religacją wiązania fosfodiesterowego i uwolnieniem cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego (D). Następnym działaniem topoizomerazy typu IA jest usunięcie jednego, negatywnego superskrętu z cząsteczki DNA po każdym cyklu katalitycznym

U wszystkich eukariontów zidentyfikowano zarówno topoiizomerazy podtypu IA, jak również IB [28]. W przypadku bakteryjnych topoiizomeraz typu I wyróżnia się aż trzy podtypy, odpowiednio IA, IB oraz IC, przy czym jedynie podtyp IA jest obecny u wszystkich opisanych mikroorganizmów, natomiast podtyp IB i IC tylko u nielicznych gatunków. Podtyp IA obejmuje topoiizomerazy I (TopA), III (TopB) oraz odwrotną gyrazę, natomiast IB niewielkie topoiizomerazy, podobne strukturalnie do enzymów identyfikowanych u pokswirusów. Do grupy IC należy nietypowy enzym, odkryty jak dotąd jedynie u *Methanopyrus kandleri* – topoiizomeraza V [77]. Wszystkie zidentyfikowane bakterie mają przynajmniej jedną topoiizomerazę typu I, która razem z gyrazą – enzymem należącym do typu II, stanowią tzw. minimalny zestaw topoiizomeraz (tabela 1).

ptacją bakterii do nowych warunków środowiskowych. Towarzysząca temu intensywna transkrypcja, wymaga zaangażowania dodatkowych cząsteczek białka TopA, którego wytwarzanie jest w takich okolicznościach podwyższone [46].

BAKTERYJNE TOPOIZOMERAZY TYPU IA

U wielu gatunków bakterii występują dwie topoiizomerazy podtypu IA - topoiizomeraza I (TopA) oraz III (TopB). Uważa się, że kluczową dla przeżycia jest topoiizomeraza I, a topoiizomeraza III pełni bliżej niewyjaśnione funkcje w komórce i nie jest obecna u wszystkich mikroorganizmów. Topoiizomerazy IA, z wyjątkiem odwrotnej gyrazy, to stosunkowo duże, monomeryczne białka o masie około 80-110 kDa. Enzymy te przeci-

Tabela 1. Obecność topoiizomeraz typu I i II u wybranych gatunków bakterii

	Topoiizomeraza I (TopA)	Topoiizomeraza III (TopB)	Topoiizomeraza IV (ParCE)	Gyraz (GyrAB)	Topoiizomeraza typu IB
<i>Streptomyces coelicolor</i>	+	-	+	+	-
<i>Streptomyces venezuelae</i>	+	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>Helicobacter pylori</i> J99	+ ¹⁾	-	-	+	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	-	-	+	-
<i>Mycobacterium avium</i>	+	-	+	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+ ²⁾
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-
<i>Yersinia pestis</i>	+	+	+	+	-
<i>Deinococcus geothermalis</i>	+	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	-

1) U bakterii *Helicobacter pylori* J99 obecne są trzy warianty białka TopA (opis w tekście)

2) Białko psIN, wykazujące homologię względem pokswirusowych topoiizomeraz typu IB

Główną rolę, poza organizacją chromosomu, topoiizomerazy pełnią w czasie replikacji i transkrypcji. Podczas replikacji, przemieszczające się widelki replikacyjne generują pozytywne superskręty przed widelkami oraz negatywne superskręty za nimi [62,90]. Topoiizomeraza I oraz gyraz, usuwając z DNA odpowiednio negatywne i pozytywne superskręty, zapewniają efektywne przemieszczanie się kompleksu replikacyjnego wzdłuż chromosomu. Natomiast podczas transkrypcji, topoiizomeraza I umożliwia usuwanie negatywnych superskrętów i zapobiega powstawaniu tzw. pętli R, tworzonych przez powstające podczas transkrypcji hybrydy DNA:RNA [13]. Rola topoiizomerazy I podczas transkrypcji jest szczególnie widoczna w warunkach stresu. Dochodzi wtedy do ekspresji dużej puli genów związanych z ada-

nają tylko jedną nić DNA. Katalizują one reakcję transestryfikacji, tworząc przejściowy kompleks kowalencyjny między grupą hydroksylową tyrozyny, a 5'-końcem przeciętej nici DNA. Następnie dochodzi do przesunięcia nietkniętej nici przez powstałe pęknięcie. Cykl katalityczny kończy się ligacją pękniętej nici, przy jednoczesnym usunięciu pojedynczego superskrętu z cząsteczki DNA [16]. Do swojej aktywności topoiizomerazy typu IA wymagają obecności kofaktorów w postaci jonów dwuwartościowych, którymi w warunkach fizjologicznych są jony magnezu. Magnez jest niezbędny do religacji wiązania fosfodiesterowego, lecz nie samego oddziaływania topoiizomerazy z DNA i tworzenia kowalencyjnego kompleksu przejściowego [94]. Topoiizomerazy podtypu IA nie wymagają również dostarczenia

Tabela 2. Wybrane właściwości bakteryjnych topoiomeraz typu I i II

	Topoiomeraza I (TopA)	Topoiomeraza III (TopB)	Topoiomeraza IV (ParCE)	Gyraza (GyrAB)	Topoiomeraza typu IB	Odwrotna gyraza	Topoiomeraza V
Mikroorganizmy	wszystkie	niektóre	niektóre	wszystkie	niektóre	Archeae	<i>M. kandleri</i>
Produkt pośredni	5'	5'	5'	5'	3'	5'	3'
Forma aktywna	homodimer	homodimer	heterotetramer	heterotetramer	homodimer	heterodimer	homodimer
Podtyp	IA	IA	IIA	IIA	IB	IA	IC
Wymaga Mg	tak	tak	nie	nie	nie	nie	nie
Wymaga ATP	nie	nie	tak	tak	nie	tak	nie
Substrat (forma DNA*)	-SC	-SC	Kat ¹⁾	+SC/-SC/Rel ²⁾	-SC/+SC	-SC/Rel	-SC/+SC

* -SC - negatywnie superskręcone DNA, +SC - pozytywnie superskręcone DNA, Rel - relaksowane DNA, Kat - splecione DNA

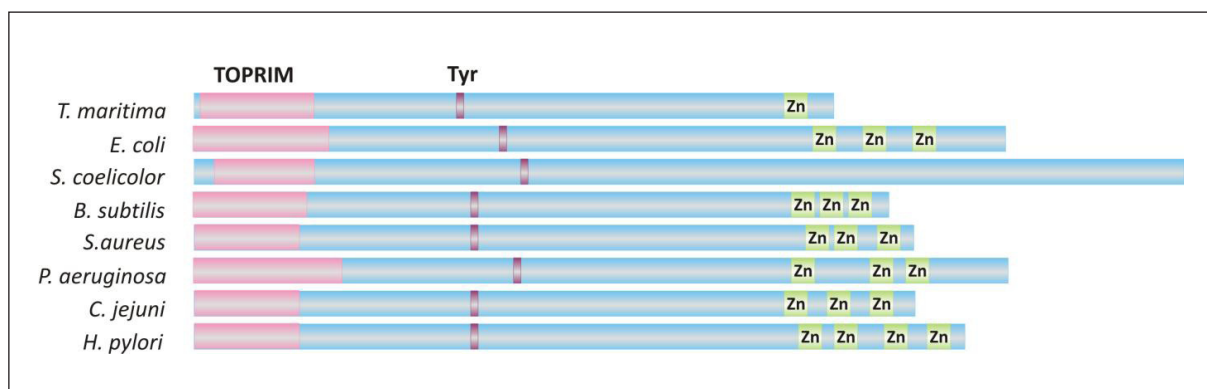
1) Topoiomeraza IV jest odpowiedzialna głównie za usuwanie katenatów, zdolna jest do relaksacji -SC i +SC DNA jednak z niską wydajnością
 2) Gyraza wprowadza negatywne superskręty

energii w postaci trifosforanów nukleozydów, wykorzystując do katalizowania reakcji przeniesienia i religacji nici DNA energię zakumulowaną w superskręconej cząsteczce DNA (tabela 2).

Topoiomerazy typu IA zbudowane są z dwóch domen - większej, tworzącej rdzeń białka, obejmującej około 600 początkowych aminokwasów oraz mniejszej, C-końcowej. W obrębie domeny N-końcowej umiejscowione jest centrum katalityczne z główną resztą tyrozyny oraz region TOPRIM (topoisomerase-prime domain) z miejscem wiązania jonów magnezu [4] (ryc. 2).

W porównaniu z domeną N-końcową, funkcja domeny C-końcowej jest znacznie słabiej poznana. W przypadku białek z *E. coli* oraz *Mycobacterium tuberculosis*

pozbawienie ich domeny C-końcowej hamuje aktywność topoiomerazową samego rdzenia [1,11]. Podobnie u bakterii *Helicobacter pylori* usunięcie całej domeny C-końcowej, a także 28-końcowych reszt aminokwasowych prowadzi do całkowitego zahamowania aktywności białka [80]. Rdzeń topoiomerazy I z *Thermatoga maritima* oraz *Streptomyces coelicolor* pozbawiony domeny C-końcowej, mimo że jego aktywność jest nieznacznie obniżona, nadal zdolny jest do przeprowadzenia pełnego cyklu katalitycznego [7,80]. Region C-końcowy jest wysoce zmienny, zarówno pod względem długości, jak również sekwencji aminokwasowej. Co ciekawe, wiele topoiomeraz typu IA, z wyjątkiem tych występujących u promieniowców, zawiera w domenie C-końcowej struktury zaangażowane w oddziaływanie z DNA - palce cynkowe. Liczba powtórzeń palców cynkowych jest zmienna u różnych gatunków bakterii i waha się od



Ryc. 2. Schematyczne porównanie budowy topoiomerazy I (TopA) u wybranych gatunków bakterii, zaznaczono umiejscowienie domeny TOPRIM, katalityczną resztę tyrozyny oraz palce cynkowe (opis w tekście)

jednego (*Thermatoga maritima*) do czterech (*H. pylori*) (ryc. 2). U promieniowców, u których topoiizomerazy IA pozbawione są palców cynkowych, niewyjaśniony jest nadal mechanizm wiązania się tych białek z DNA. Natomiast u pozostałych mikroorganizmów struktury te są na tyle istotne, że ich usunięcie prowadzi do zahamowania aktywności enzymu i w wielu przypadkach jest dla komórek letalne.

Mimo że aktywność topoiizomeraz jest istotna dla prawidłowego przebiegu podstawowych procesów komórkowych, takich jak replikacja i transkrypcja, możliwość ich usunięcia pozostaje kwestią dyskusyjną. Początkowo uważano, że u *E. coli* usunięciu genu *topA* towarzyszyć musi delecja co najmniej jednego z genów kodujących podjednostki bakteryjnej gyrazy [19,64]. Wyniki te dodatkowo potwierdzały prace prowadzone przez Hammonda i Overbye'a [32]. Wykorzystując niskie stężenia nowobiocyny (inhibitor bakteryjnej gyrazy), wyselekcjonowane zostały szczepy *E. coli* niosące mutacje w obrębie genu *topA*, które powodują zahamowanie aktywności enzymatycznej topoiizomerazy. Jednak możliwość usunięcia genu *topA* z chromosomu niektórych mikroorganizmów, w tym również *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* oraz *Shigella flexneri* pozostaje nadal kwestią sporną. Stosując technikę insercji transpozonów udało się wyodrębnić szczepy z uszkodzonym genem *topA*. Wyniki te mogą sugerować, że funkcja topoiizomerazy I, nie jest u tych bakterii aż tak istotna dla ich przeżycia, jak pierwotnie sądzono [19,55,78]. Natomiast w przypadku wielu innych bakterii patogennych, w tym *M. tuberculosis* oraz *H. pylori*, białko TopA jest niezbędne do przetrwania, a próby jego usunięcia kończyły się niepowodzeniem [69,80]. Co ciekawe, szczep J99 *H. pylori* ma dwa geny kodujące dodatkowe warianty białka TopA – TopA2 oraz TopA3. Przewidywane produkty tych genów to białka o mniejszej masie cząsteczkowej, pozbawione palców cynkowych oraz wykazujące niską homologię, odpowiednio 34 i 37% identyczności względem białka TopA. Natomiast brak jest doniesień, czy geny *topA2* oraz *topA3* ulegają w komórce ekspresji. Niewiele również wiadomo na temat roli samego białka TopA u *Helicobacter*. Jak dotąd nie wyjaśniono także, dlaczego bakterie te mają kilka paralogów TopA. Możliwe, że intensywnie zachodzące w komórkach *Helicobacter* procesy rekombinacji materiału genetycznego, wymagają obecności dodatkowych topoiizomeraz.

Zdecydowanie słabiej poznana jest bakteryjna topoiizomeraza III (TopB). Uważa się, że topoiizomeraza III, należąca, podobnie jak topoiizomeraza I, do typu IA i kodowana u bakterii przez gen *topB*, odgrywa rolę w procesie dekatenaacji powstałych po replikacji cząsteczek DNA [58]. *In vitro* topoiizomeraza III zdolna jest również do zmiany przestrzennej struktury RNA [85]. U *E. coli* delecja genu *topB* nie wpływa znacząco na przeżywalność komórek, ale prowadzi do zwiększenia częstości spontanicznych delecji w chromosomie. Sugeruje to rolę topoiizomerazy III w procesach rekombinacji i naprawy materiału genetycznego [71,87]. Całkowicie odrębną grupę stanowią odwrotne

gyrazy również należące do podtypu IA topoiizomeraz. Enzymy te zidentyfikowane zostały jedynie u archeonów. U termofilnych *Archaea* odwrotna gyraza odpowiedzialna jest za wprowadzanie dodatknych superskrętów, co jest jedną ze strategii, pozwalających na ochronę własnego materiału genetycznego przed szkodliwym wpływem wysokiej temperatury [60].

BAKTERYJNE TOPOIZOMERAZY IB JAKO EFEKT HORYZONTALNEGO TRANSFERU GENÓW

Geny kodujące topoiizomerazy typu IB występują u wszystkich eukariontów, pokswirusów [8] i mimiwirusów [66], lecz nie u *Archaea*. Natomiast w przypadku bakterii zidentyfikowane zostały jedynie u nielicznych gatunków (tab. 2). W porównaniu z pozostałymi przedstawicielami topoiizomeraz typu I, wirusowe i bakteryjne topoiizomerazy IB są najmniejszymi enzymami tego typu. Są to białka o masie około 33 kDa, zbudowane z 330-350 reszt aminokwasowych. Topoiizomerazy typu IB katalizują proces relaksacji DNA według mechanizmu polegającego na nacięciu pojedynczej nici DNA i utworzeniu przejściowego kompleksu, kowalencyjnie związanego z uwolnionym 3'-końcem [44]. Następnie dochodzi do kontrolowanej rotacji uwolnionego końca DNA, usuwania kolejnych superskrętów i religacji wiązania fosfodiesterowego. Dzięki takiemu mechanizmowi enzymy te zdolne są do relaksacji zarówno negatywnie, jak i pozytywnie superskręconego DNA. Bakteryjne topoiizomerazy IB cechuje podobieństwo do topoiizomeraz wirusowych i eukariotycznych przejawiające się w zbliżonym rozmiarze, sekwencji aminokwasowej oraz podobnej strukturze centrum katalitycznego, zachowującego układ 5 konserwatywnych reszt aminokwasowych – RKKRH [91]. Wirusowe topoiizomerazy IB wykazują swoistość względem związanej sekwencji (5'-CCCTT) [36,37,51]. Natomiast nie wykazano żadnej swoistości w przypadku scharakteryzowanych do tej pory bakteryjnych topoiizomeraz IB z *Deinococcus radiodurans* [44] oraz *Pseudomonas aeruginosa* [38]. Nie do końca znane jest pochodzenie bakteryjnych topoiizomeraz IB. Homologia między tymi enzymami pochodzącymi z różnych gatunków oraz ich odmienny od topoiizomeraz IA mechanizm działania sugerują, że topoiizomerazy IB tworzą niezależną rodzinę białek, ewolucyjnie wywodzących się od innego przodka niż topoiizomerazy IA [44]. Ze względu na duże podobieństwo topoiizomeraz IB u organizmów niespokrewnionych ze sobą sugeruje się udział transferu horyzontalnego w procesie propagacji genu między poszczególnymi domenami życia, a nie jak wcześniej sugerowano, eliminacji genu w toku ewolucji [10,44]. Warto również zauważyć, że jeśli w genomie bakterii obecny jest gen kodujący topoiizomerazę typu IB, to brak jest wtedy często genu *topB* kodującego topoiizomerazę III (należącą do typu IA). Niektóre gatunki bakterii nie mają jednak ani topoiizomerazy IB, ani topoiizomerazy III (*H. pylori*, *M. tuberculosis*).

Z powodu niepełnej wiedzy dotyczącej topoiizomeraz IB u bakterii, a także braku doniesień na temat ich komórko-

wej funkcji, obecnie białka te nie wydają się dobrym celem dla nowych antybiotyków. Dodatkowo, ich obecność tylko u wybranych gatunków bakterii sprawia, że topoizomerazy IB wydają się lepszym celem terapii przeciwwirusowych, niż przeciwbakteryjnych.

TOPOIZOMERAZA V z *METHANOPYRUS KANDLERI* – WYJĄTKOWY ENZYM Z WYJĄTKOWEGO MIKROORGANIZMU

Jedynym, zidentyfikowanym przedstawicielem topoizomeraz typu IC jest topoizomeraza V (TopoV) z *Methanopyrus kandleri* [77]. Mikroorganizm ten bytuje w ekstremalnie wysokiej temperaturze, sięgającej aż 110°C oraz w środowisku o wysokim zasoleniu [35]. Początkowo topoizomeraza V klasyfikowana była jako enzym należący do podtypu IB, ze względu na tworzenie charakterystycznego dla tej grupy kompleksu przejściowego z 3'-końcem DNA oraz zdolność do relaksacji zarówno pozytywnie, jak również negatywnie superskręconego DNA w sposób niezależny od obecności jonów dwuwartościowych oraz ATP [81]. Poznanie sekwencji nukleotydowej genomu *M. kandleri* [76] ujawniło, że rdzeń białka, odpowiedzialny za aktywność topoizomerażową, nie wykazuje homologii z żadnymi znanymi bakteryjnymi topoizomerazami, co zdecydowało o wyodrębnieniu nowej klasy tych enzymów. Nowo odkryte białko wykazywało natomiast podobieństwo do eukariotycznych topoizomeraz IB. Przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej topoizomerazie I rozpoznawały enzym z *M. kandleri*. Nie wykazano jednak charakterystycznego dla eukariotycznych topoizomeraz IB hamowania ich aktywności przez kamptotecynę [77].

Podobnie jak w przypadku pozostałych topoizomeraz, topoizomeraza V zbudowana jest z dwóch domen – odpowiednio domeny N- i C-końcowej, jednak struktura trzeciorzędowa jest inna w porównaniu z topoizomerazami IA oraz IB. Domena C-końcowa o masie około 68 kDa nie jest niezbędna do pełnej aktywności topoizomerażowej, lecz jej usunięcie znacząco zwiększa wrażliwość enzymu na wysokie stężenie soli. W przeciwieństwie do innych, znanych topoizomeraz, TopoV wykazuje zdolność naprawy DNA, za którą odpowiedzialna jest właśnie domena C-końcowa [9]. Domena N-końcowa, o masie około 44 kDa, tworząca rdzeń białka, zawiera katalityczną resztę tyrozyny w pozycji 226 i odpowiedzialna jest za wiązanie i relaksację DNA. Jednak rozmieszczenie głównych dla procesu katalizy aminokwasów jest odmiennie w porównaniu z pozostałymi topoizomerazami typu I. Domena C-końcowa tworzona jest natomiast przez powtórzenia motywu HhH (helix-hinge-helix), otaczające rdzeń białka [59]. Co ciekawe, topoizomeraza V relaksuje DNA według mechanizmu kontrolowanej rotacji, typowego dla topoizomeraz typu IB. Jednak w przeciwieństwie do nich nie ma w swojej strukturze charakterystycznego zagłębienia, odpowiedzialnego za wiązanie i przemieszczanie nici DNA. Sam proces wiązania się topoizomerazy IC do DNA wymaga zmian strukturalnych w obrębie białka. Obserwacje wskazujące, że białko wykazuje małą aktywność poniżej temperatury

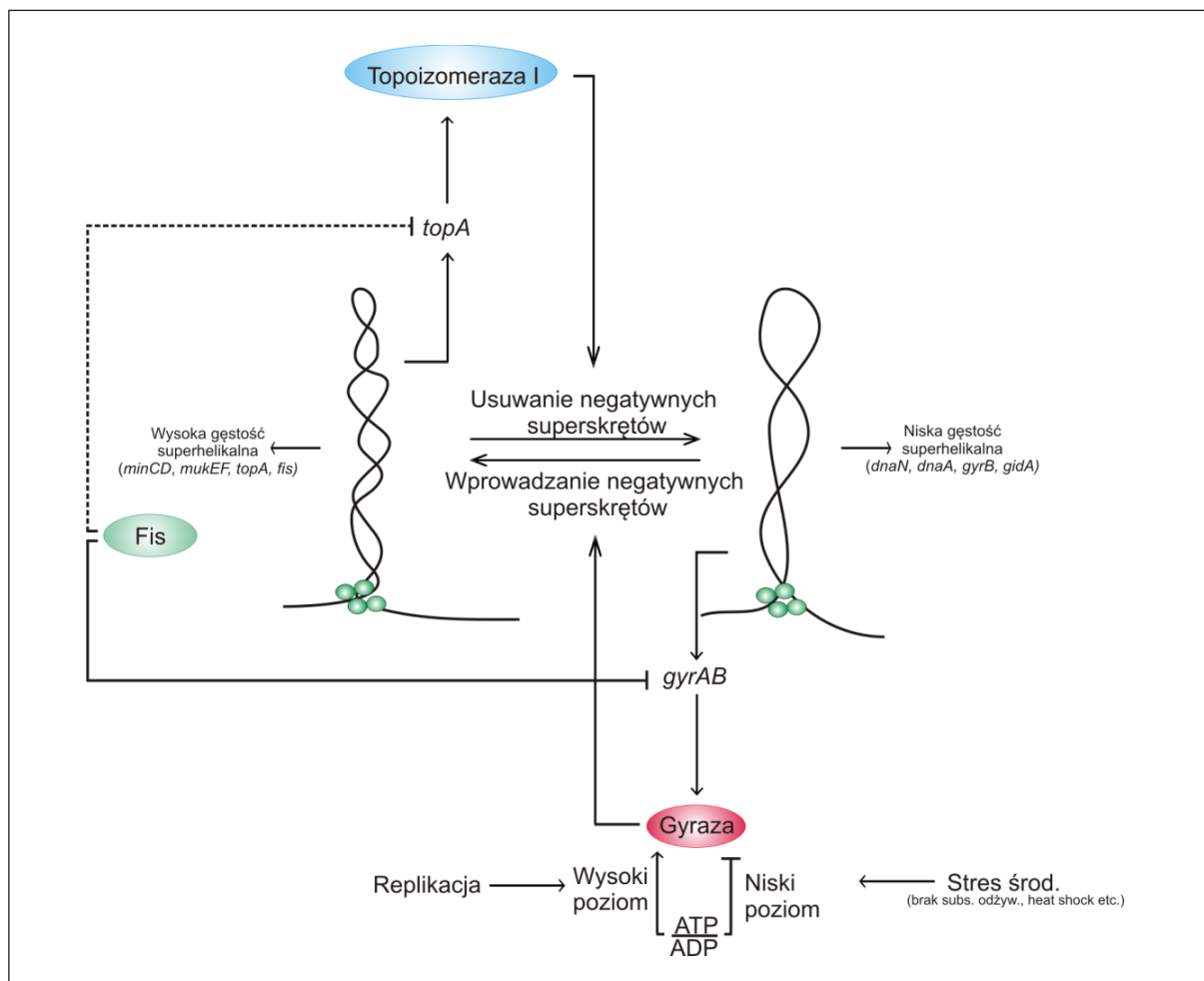
65°C sugerują, że do zmian strukturalnych dochodzi pod wpływem podwyższonej temperatury, która jest naturalnym środowiskiem bytowania bakterii *M. kandleri*. Wydaje się zatem, że wyodrębnienie w toku ewolucji nowej grupy topoizomeraz typu IA jest efektem przystosowania maszynierii kontrolującej topologię chromosomu do skrajnych warunków środowiskowych, w których bytuje *M. kandleri*. Jednak zidentyfikowanie tak nietypowej topoizomerazy jedynie u *M. kandleri* może sugerować wirusowe pochodzenie tego enzymu. Wirusowy gen, kodujący topoizomerażę V, w wyniku transferu horyzontalnego mógł zostać wbudowany w genom mikroorganizmu dającego początek linii ewolucyjnej, z której wywodzi się *M. kandleri*. Charakterystyka kolejnych termofilnych organizmów może potencjalnie poszerzyć listę przedstawicieli topoizomeraz typu IC oraz dać jednoznaczną odpowiedź, dotyczącą pochodzenia tej grupy enzymów.

W przeciwieństwie do topoizomeraz należących do podtypu IB oraz IC, topoizomerazy IA są szeroko rozpowszechnione i występują u wszystkich znanych gatunków bakterii. Dodatkowo, rola biologiczna topoizomeraz IA jest zdecydowanie lepiej poznana w porównaniu z pozostałymi przedstawicielami typu I. Z tego względu wydają się lepszym celem terapii przeciwbakteryjnych i pod tym kątem będą omówione w dalszej części artykułu.

ROLA TOPOLOGII CHROMOSOMU W EKSPRESJI GENÓW

Replikacja i transkrypcja są podstawowymi procesami warunkującymi prawidłowe funkcjonowanie każdej żywej komórki. Jednocześnie zachodzenie obu procesów jest zależne od przestrzennej organizacji chromosomu. Prawidłowa topologia chromosomu, czyli tzw. homeostaza topologiczna, jest efektem antagonistycznego działania dwóch topoizomeraz – topoizomerazy I oraz gyrazy (ryc. 3). Aktywność obu białek zmienia się w czasie cyklu komórkowego i/lub w odpowiedzi na sygnały docierające do komórki ze środowiska (szok termiczny, wyczerpanie substancji odżywczych i inne), prowadząc do zmian w ekspresji całych grup genów. Dodatkowo stwierdzono, że u *E. coli* na homeostazę przestrzennej aranżacji chromosomu wpływa wiele białek strukturalnych (NAPs), w tym przede wszystkim białko Fis (factor for inversion stimulation).

Poprzez lokalne działanie białko Fis prowadzi do powstawania mikrodomen, których topologia jest niezależna od globalnej topologii chromosomu [65]. W ten sposób białko Fis moduluje precyzyjnie aktywność transkrypcyjną określonych grup genów umiejscowionych w obrębie tworzonej mikrodomeny. U *E. coli* aktywność genów *fis*, *gyrAB* oraz *topA* jest wzajemnie powiązana i regulowana stopniem superskręcenia chromosomu (ryc. 3) [40,70,89]. Oprócz genów kodujących wspomniane wyżej białka, zidentyfikowano ponad 300 innych genów (czyli 7% wszystkich genów *E. coli*), których ekspresja jest zależna od stopnia superskręcenia chromosomu. Wśród nich znajdują się geny, których produkty zaangażowane są w procesy replikacji (*dnaA*, *dnaN*), kondensacji chromosomów (*mukBEF*), tworzenie



Ryc. 3. Model homeostazy topologicznej u bakterii *E. coli*. Antagonistyczne działanie topoiomerazy I (TopA) oraz gyrazy (GyrAB) prowadzi do kontroli dynamiki topologii chromosomu i swobodnego przechodzenia poszczególnych domen między stanami o niskiej i wysokiej gęstości superhelikalnej. Topologia poszczególnych domen chromosomu jest jednym z mechanizmów kontroli ekspresji genów bakteryjnych. Jednym z genów zależnych od topologii jest gen *fis*, kodujący strukturalne białko Fis. Białko Fis w wysokim stężeniu hamuje ekspresję genów *gyrAB*. Natomiast wpływ na ekspresję genu *topA* jest dwójaki. Przy wysokim stężeniu białko Fis hamuje ekspresję genu topoiomerazy, przy niskim jest jego aktywatorem. Dodatkowo, na topologię chromosomu wpływa stan energetyczny komórki. Ze względu na to, że gyraza do swojej aktywności wymaga dostarczenia energii w postaci ATP, wszelkie zmiany stosunku ATP/ADP w komórce wpływają na strukturę chromosomu. Spadek poziomu ATP obserwowany jest w sytuacjach stresu środowiskowego; w efekcie aktywność gyrazy jest zahamowana, a topologia chromosomu zmieniona. Prowadzi to do ekspresji wielu genów zależnych od topologii DNA i związanych z adaptacją bakterii do nowych warunków bytowania

przegród poprzecznych (*minCD*), a także rekombinację materiału genetycznego (*xerC*). Ekspresja tych genów jest zahamowana, gdy chromosom znajduje się w stanie zrelaksowanym (relaxation-repressed genes) [61]. Topologia chromosomu jest zatem niezwykle ważna dla prawidłowego funkcjonowania komórki i odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji wielu genów w sposób niezależny od białek regulatorowych. Cozzarelli i wsp. [61] zaproponowali hipotezę, według której odpowiednia topologia chromosomów u *E. coli* jest punktem kontrolnym poprzedzającym ich segregację. Po osiągnięciu odpowiedniego stanu topologicznego dochodzi do ekspresji wielu genów związanych z dystrybucją DNA do komórek potomnych. W tym ujęciu zmiana topologii chromosomu może być rozpatrywana jako nadrzędny mechanizm regulujący ekspresję genów zależnie od etapu cyklu komórkowego.

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień dotyczących roli przestrzennej organizacji chromosomu w regulacji ekspresji genów u bakterii. A zatem, białka zaangażowane w modyfikowanie topologii czy organizację chromosomu, w tym przede wszystkim topoiomerazy, mogą pośrednio pełnić funkcję regulatorów transkrypcji. Geny zależne od topologii kodują często białka związane z podstawowymi procesami komórkowymi (replikacja, transkrypcja, segregacja chromosomów) oraz z adaptacją do warunków środowiskowych, a u gatunków patogennych z wirulencją.

TOPOLOGIA CHROMOSOMU A WIRULENCJA

Zaobserwowano, że zmiany w topologii chromosomu następują w odpowiedzi na wiele czynników środowiskowych, takich jak stres osmotyczny i temperaturowy, odpo-

wiedź na zmianę warunków tlenowych oraz ograniczenie substancji odżywczych [68]. Do zmian takich dochodzi m.in. podczas inwazji chorobotwórczych mikroorganizmów na organizm gospodarza. Wykazano, że sam proces inwazji oraz późniejszej adaptacji do nowych warunków bytowania związany jest z ekspresją wielu genów kodujących tzw. czynniki wirulencji. Co ciekawe, u wielu patogennych bakterii aktywność tych genów skorelowana jest ze stopniem superskręcenia chromosomu [21,29,67,92]. U uropatogennych szczepów *E. coli* zaobserwowano, że ekspresja genów kodujących białka budujące fimbrie (struktury komórkowe umożliwiające adhezję do komórek gospodarza) jest zależna od aktywności topoizomerazy oraz białka Lrp modulującego topologię chromosomu [41]. Podobnie bakterie *Salmonella* Typhimurium wykorzystują fimbrie w celu adhezji do komórek gospodarza, jednak w przeciwieństwie do chorobotwórczych *E. coli*, są w stanie również przenikać do wnętrza komórek nabłonka i dalej do makrofagów [14,50]. Zależnie od bytowania bakterii *S. Typhimurium*, w komórkach nabłonkowych lub makrofagach dochodzi do aktywacji różnych grup genów wirulencji, umiejscowionych odpowiednio w regionach SPI1 oraz SPI2 – tzw. „wyspy patogenności”. Ekspresja genów z regionu SPI1 jest aktywowana, gdy gęstość superhelikalna chromosomu wzrasta (komórki epitelialne), podczas gdy geny SPI2 ulegają ekspresji w odpowiedzi na zmniejszenie gęstości superhelikalnej DNA (makrofagi) [30]. Innym przykładem chorobotwórczych bakterii, u których zaobserwowano, że topologia jest ściśle powiązana z cyklem komórkowym jest *H. pylori*. Wykazano, że odpowiedni stan superskręcenia DNA u tych bakterii jest niezbędny do inicjacji replikacji [20]. Takiej zależności nie zaobserwowano natomiast w przypadku *E. coli*. Uważa się, że u bakterii *H. pylori* topologia chromosomu może być również głównym czynnikiem regulującym aktywność poszczególnych genów zależnie od fazy wzrostu bakterii. Zwłaszcza, że u *Helicobacter* liczba zidentyfikowanych białek regulatorowych jest zdecydowanie niższa w porównaniu z innymi bakteriami [3]. Relaksacja chromosomu, spowodowana działaniem nowobiocyny inhibitora gyrazy, wpływała u *H. pylori* na ekspresję puli genów związanych z odpowiedzią na stres środowiskowy (*hspA*, *hspB*, *dnaK*) oraz genów umiejscowionych w regionie *cag* (pathogenicity island) i związanych z wirulencją [92]. Zauważono, że niektóre geny opisane jako niezbędne do bytowania *H. pylori* w żołądku, znajdują się w bliskim sąsiedztwie genów związanych z regulacją topologii chromosomu. Jednym z czynników, związanych z adaptacją bakterii *H. pylori* do bytowania w organizmie gospodarza, jest wytwarzanie rzęsek [45,79] zbudowanych z białek zwanych flagelinami - produktów genów *flaA* oraz *flaB*. Nie zidentyfikowano jednak żadnego nadrzędnego regulatora, który łączyłby (podobnie do genów *flhBC* u *Enterobacteriaceae*) ekspresję obu genów flagelin z cyklem komórkowym [56]. Region promotorowy genu *flaB* pokrywa się z regionem promotorowym genu *topA*, przy czym ekspresja obu genów przebiega w przeciwnych kierunkach. U *H. pylori* aranżacja genów na chromosomie jest wysoce zmienna, jednak wykazano, że u 15 badanych, chorobotwórczych szczepów lokalizacja obu genów jest zachowawcza, a odległość między miejscami startu trans-

krypcji jest mniej więcej stała [80]. Co ciekawe, promotor genu kodującego drugi wariant flageliny (*flaA*) charakteryzuje się nietypową budową; odległość między -10 oraz -35 jest skrócona w porównaniu z typowymi promotorami bakteryjnymi i wynosi 13 pz. Sugeruje się, że ze względu na odmienną sekwencję promotora, istotną rolę w jego aktywności może odgrywać topologia chromosomu [88]. Dodatkowo wykazano, że gen *flhR*, kodujący białko regulatorowe związane z ekspresją flagelin, znajduje się w jednym operonie z genem kodującym podjednostkę A gyrazy [57].

Liczne, uzyskane dane, sugerują zależność ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji od topologii chromosomu oraz udział samych topoizomerazy w procesie adaptacji chorobotwórczych mikroorganizmów do warunków panujących w ludzkim organizmie.

BAKTERYJNA TOPOIZOMERAZA I JAKO CEL DLA ANTYBIOTYKÓW

Do tej pory uwaga badaczy poszukujących celów dla substancji przeciwbakteryjnych zwrócona była głównie w kierunku topoizomerazy typu II. Dla tych białek zidentyfikowano wiele swoistych związków, takich jak fluorochinolony (ciprofloksacyna, kwas nalidiksowy) oraz nowobiocyna. Bakteriobójczy charakter fluorochinolonów nie przejawia się jednak w hamowaniu aktywności enzymatycznej samego białka, natomiast prowadzi do stabilizacji kowalencyjnego kompleksu przejściowego topoizomeraza:DNA [47]. Związki te, określane mianem „topoisomerase poisons”, prowadzą w efekcie to zahamowania procesów replikacji chromosomów oraz ich segregacji do potomnych komórek. Poszukiwanie związków, które w sposób selektywny wiązałyby się z białkiem TopA (na podobnej zasadzie jak fluorochinolony), hamując jej aktywność na etapie religacji wiązania fosfodiestrowego i prowadząc do akumulacji szkodliwych dla komórki intermediatów reakcji, wydaje się jedną z bardziej obiecujących strategii. Nowe nadzieje w poszukiwaniu tego typu inhibitorów topoizomerazy I budzi technika opracowana przez Tsai i wsp. [83]. Wykorzystując powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR – surface plasmon resonance) i immobilizowane białko TopA z *M. tuberculosis* zidentyfikowali przeciwciała, które w sposób selektywny hamowały aktywność enzymatyczną białka. Wydaje się, że technika ta może być również z powodzeniem stosowana do wstępnego poszukiwania mniejszych cząsteczek o charakterze inhibitorów i w przyszłości stanowiących nową klasę antybiotyków.

Rolę topoizomerazy I w prawidłowym funkcjonowaniu komórki należy rozpatrywać na kilku płaszczyznach. Potencjalne antybiotyki celujące w topoizomerazę I działałyby również na kilku poziomach. Działając globalnie, zmieniałyby topologię chromosomu i zaburzały profil ekspresji jednocześnie wielu genów. Hamowałyby również namnażanie się patogennych mikroorganizmów (blokując proces replikacji DNA) oraz uniemożliwiałby adaptację do warunków panujących w organizmie gospodarza w czasie infekcji (zmieniając ekspresję czynników zjadliwości). Funkcja topoizomerazy I w procesach replikacji i transkrypcji polega przede wszystkim

na usuwaniu negatywnych superskrętów powstających w efekcie przemieszczania się wzdłuż nici DNA odpowiednio kompleksu replikacyjnego i transkrypcyjnego. Przemieszczanie polimerazy DNA w trakcie replikacji wymaga rozplecenia cząsteczki DNA na dużym obszarze, co powoduje powstawanie przeszkód topologicznych w postaci superskrętów. U *Mycobacterium* zidentyfikowano zależność między topoiizomerazą I a replikacyjnym białkiem SSB (single strand binding protein). Białko SSB stymuluje aktywność topoiizomerazową białka TopA. W ten sposób w regionie tworzenia się kompleksów replikacyjnych (tzw. primosomów), aktywność białka TopA jest podwyższona [73]. Natomiast u *E. coli* białko TopA jest wprowadzane do kompleksu transkrypcyjnego przez oddziaływanie z beta-podjednostką polimerazy RNA (Rp σ B) [22]. Dodatkowo wpływ topoiizomerazy I na replikację i transkrypcję jest efektem regulacji ekspresji genów kodujących białka istotne dla obu tych procesów. W ten sposób udział topoiizomeraz w wyżej wymienionych procesach jest efektem ich działania na dwóch poziomach organizacji.

Adaptacja patogennych szczepów do warunków panujących w komórkach gospodarza jest rezultatem odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiskowe, które pociągają za sobą zmiany w topologii chromosomu. W efekcie dochodzi do aktywacji genów wirulencji, które warunkują przeżywalność chorobotwórczych bakterii (zob. poprzedni rozdział). W procesie adaptacji aktywność topoiizomerazowa jest dodatkowo modulowana na skutek oddziaływań z innymi białkami. U *M. tuberculosis* zidentyfikowano oddziaływanie topoiizomerazy I z białkiem Rv1495 – homologiem białka MazF, będącego składnikiem systemu typu toksyna-antytoksyna MazEF, który warunkuje przeżywalność prątków w makrofagach [18,24]. Oddziaływanie między białkiem Rv1495 a topoiizomerazą I skutkuje obniżeniem aktywności zarówno topoiizomerazowej białka TopA, jak również nukleazowej białka Rv1495 [34]. Badania pozwoliły na wyodrębnienie fragmentu białka Rv1495, składającego się z 28 reszt aminokwasowych, zdolnego do oddziaływania z topoiizomerazą i blokującego jej aktywność. Eksperyment z zastosowaniem topoiizomerazy I z *E. coli* wykazał, że uzyskany peptyd w sposób swoisty hamował aktywność tylko białka TopA z *Mycobacterium* [34]. Stwarza to możliwość wykorzystania wspomnianego peptydu jako selektywnie działającego leku hamującego aktywność topoiizomerazową. Jednak dostarczenie tak dużej cząsteczki do komórek *Mycobacterium* w miejscu infekcji (przez błonę makrofagów oraz grubą ścianę komórkową prątków), jest potencjalnie czynnikiem ograniczającym jego zastosowanie. Alternatywą pozostaje poszukiwanie cząsteczek blokujących samo oddziaływanie między Rv1495 a TopA, które zaburzałyby proces adaptacji prątków do warunków panujących w makrofagach, tym samym uniemożliwiając ich bytowanie wewnątrz komórek gospodarza.

Badania oddziaływania białka TopA z innymi składnikami komórkowymi sugerują także, że związki o charakterze lipidowym mogłyby pełnić rolę potencjalnych

antybiotyków hamujących jego aktywność. Wyniki uzyskane przez Sekimizu i wsp. [53] sugerują wiązanie się topoiizomerazy I u *E. coli* z wewnętrzną błoną komórkową i udział składników budujących błonę, jako czynnika mogącego regulować aktywność enzymatyczną białka TopA. Obserwowano, że ponad 30% komórkowej puli topoiizomerazy I było oczyszczane jako frakcja związana z błonami komórkowymi. Wykazano również, że kardiolipina efektywnie hamowała aktywność topoiizomerazy I *in vitro*, podczas gdy takiego efektu nie powodował fosfatydyloglicerol, jeden z głównych składników bakteryjnej błony komórkowej. Wzajemną zależność między białkiem TopA oraz kardiolipiną uzupełniają badania Cozzarello i wsp. [61]. Wykazali oni zależność ekspresji genu *cls*, kodującego syntezę kardiolipiny, od topologii chromosomu. Transport antybiotyków o charakterze hydrofobowym przez ścianę komórkową, które na podobnej zasadzie jak kardiolipina, byłyby w stanie hamować aktywność topoiizomerazy I, byłby znacznie ułatwiony. Brak jest jednak doniesień na temat badań prowadzonych nad tego typu antybiotykami.

Dużo większe nadzieje wiąże się natomiast z odkrytymi niedawno pochodnymi benzimidazoli. Wykazano wiele terapeutycznych właściwości tych związków, w tym również potencjalne ich zastosowanie jako czynników bakteriobójczych [12]. Praca Armanda i wsp. [5] wskazuje, że związki oparte na bazie benzimidazolu koordynacyjnie wiążące miedź, są efektywnymi inhibitorami topoiizomerazy I u *E. coli* i mogą mieć potencjalne zastosowanie w przyszłych terapiach skierowanych przeciwko patogenym bakteriom Gram-ujemnym [5]. Jednakże molekularne podstawy działania tych związków na topoiizomerazy nie są jeszcze poznane.

PODSUMOWANIE

Strukturalnie odległe od swoich eukariotycznych odpowiedników, bakteryjne topoiizomery I wydają się doskonałym celem nowego typu swoistych terapii antybakteryjnych. Co ciekawe, wiele ludzkich patogenów ma tylko jeden enzym typu I (tabela 1), stąd wykazuje zwiększoną wrażliwość na wszelkie czynniki wpływające na jego aktywność. Gram-dodatnie, patogenne bakterie z rodzaju *Mycobacterium* – *M. tuberculosis* oraz *M. leprae*, będące czynnikami etiologicznymi odpowiednio gruźlicy oraz trądu, zawierają minimalny zestaw topoiizomeraz – topoiizomerazę I oraz gyrazę. U wielu bakterii Gram-dodatnich głównym celem dla fluorochinolonów jest topoiizomeraza IV, w drugiej kolejności dopiero bakteryjna gyraza [27,31]. Brak topoiizomerazy IV u *Mycobacterium* sprawia, że pochodne fluorochinolonów nie są efektywnymi antybiotykami w walce z tymi patogenami, stąd poszukuje się nowych celów uchwytu dla leków. Ze względu na występowanie tylko jednej topoiizomerazy typu I, której usunięcie jest dla *Mycobacterium* letalne, enzym ten wydaje się doskonałym celem dla nowych terapii przeciwko prątkom.

W kontekście rozprzestrzeniania się szczepów lekoopornych, poszukiwanie nowych antybiotyków wydaje

się sprawą priorytetową. Coraz większa liczba doniesień dotyczących mechanizmów kontroli aktywności bakteryjnych topozomeraz oraz rozwój technik pozwalających na identyfikowanie związków hamujących ich aktywność w niedalekiej przyszłości pozwoli na wyodrębnienie nowej klasy antybiotyków i ułatwi walkę z patogennymi mikroorganizmami. Techniki oparte o przesiewowe przeszuki-

wanie bibliotek związków chemicznych lub modelowanie *in silico* są dodatkowo wspierane wynikami krystalograficznymi. Rozwiązanie struktury przestrzennej topozomerazy I z *E. coli* [93] oraz topozomerazy I z *Thermatoga maritima* [33] dostarczyło cennych informacji na temat mechanizmu wiązania oraz relaksacji DNA i stanowi doskonały punkt wyjścia do dalszych poszukiwań.

PIŚMIENICTWO

- [1] Ahumada A., Tse-Dinh Y.C.: The role of the Zn(II) binding domain in the mechanism of *E. coli* DNA topoisomerase I. *BMC Biochem.*, 2002; 3: 13
- [2] Allardet-Servent A., Michaux-Charachon S., Jumas-Bilak E., Karayan L., Ramuz M.: Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 7869-7874
- [3] Alm R.A., Trust T.J.: Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J. Mol. Med.*, 1999; 77: 834-846
- [4] Aravind L., Leipe D.D., Koonin E.V.: Toprim - a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res.*, 1998; 26: 4205-4213
- [5] Armand F., Parveen S., Afzal M., Shahid M.: Synthesis, characterization, biological studies (DNA binding, cleavage, antibacterial and topoisomerase I) and molecular docking of copper(II) benzimidazole complexes. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2012; 114: 15-26
- [6] Azam T.A., Ishihama A.: Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 33105-33113
- [7] Bao K., Cohen S.N.: Reverse transcriptase activity innate to DNA polymerase I and DNA topoisomerase I proteins of *Streptomyces telomere* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 14361-14366
- [8] Bauer W.R., Ressner E.C., Kates J., Patzke J.V.: A DNA nicking-closing enzyme encapsidated in vaccinia virus: partial purification and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977; 74: 1841-1845
- [9] Belova G.I., Prasad R., Kozyavkin S.A., Lake J.A., Wilson S.H., Slesarev A.I.: A type IB topoisomerase with DNA repair activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 6015-6020
- [10] Benarroch D., Claverie J.M., Raoult D., Shuman S.: Characterization of mimivirus DNA topoisomerase IB suggests horizontal gene transfer between eukaryal viruses and bacteria. *J. Virol.*, 2006; 80: 314-321
- [11] Bhaduri T., Nagaraja V.: DNA topoisomerase I from *Mycobacterium smegmatis*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 1994; 31: 339-343
- [12] Bürli R.W., McMinn D., Kaizerman J.A., Hu W., Ge Y., Pack Q., Jiang V., Gross M., Garcia M., Tanaka R., Moser H.E.: DNA binding ligands targeting drug-resistant Gram-positive bacteria. Part 1: Internal benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004; 14: 1253-1257
- [13] Cheng B., Rui S., Ji C., Gong V.W., Van Dyk T.K., Drolet M., Tse-Dinh Y.C.: RNase H overproduction allows the expression of stress-induced genes in the absence of topoisomerase I. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003; 221: 237-242
- [14] Cróinin O.T., Carroll R.K., Kelly A., Dorman C.J.: Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 2006; 62: 869-882
- [15] Dame R.T.: The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.*, 2005; 56: 858-870
- [16] Dekker N.H., Rybenkov V.V., Duguet M., Crisona N.J., Cozzarelli N.R., Bensimon D., Croquette V.: The mechanism of type IA topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 12126-12131
- [17] Delius H., Worcel A.: Electron microscopic studies on the folded chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1974; 38: 53-58
- [18] Diaz R., Siddigi N., Rubin E.J.: Detecting genetic variability among different *Mycobacterium tuberculosis* strains using DNA microarrays technology. *Tuberculosis*, 2006; 86: 314-318
- [19] DiNardo S., Voelkel K.A., Sternglanz R., Reynolds A.E., Wright A.: *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, 1982; 31: 43-51
- [20] Donczew R., Weigel C., Lurz R., Zakrzewska-Czerwinska J., Zawilak-Pawlik A.: *Helicobacter pylori* oriC - the first bipartite origin of chromosome replication in Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40: 9647-9660
- [21] Dorman C.J.: DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.*, 1991; 59: 745-749
- [22] Drolet M., Bi X., Liu L.F.: Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 2068-2074
- [23] Ebersbach G., Jacobs-Wagner C.: Exploration into the spatial and temporal mechanisms of bacterial polarity. *Trends Microbiol.*, 2007; 15: 101-108
- [24] Engelberg-Kulka H., Hazan R., Amitai S.: mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 4327-4332
- [25] Espeli O., Mercier R., Boccard F.: DNA dynamics vary according to macrodomain topography in the *E. coli* chromosome. *Mol. Microbiol.*, 2008; 68: 1418-1427
- [26] Ferdows M.S., Barbour A.G.: Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 5969-5973
- [27] Fernandez-Moreira E., Balas D., Gonzalez I., de la Campa A.G.: Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase IV than DNA gyrase native proteins. *Microb. Drug Resist.*, 2000; 6: 259-267
- [28] Forterre P., Gribaldo S., Gabelle D., Serre M.C.: Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 2007; 89: 427-446
- [29] Fournier B., Klier A.: Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 2004; 150: 3807-3819

- [30] Galán J.E., Curtiss R. 3rd: Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.*, 1990; 58: 1879-1885
- [31] Garcia M.T., Blázquez M.A., Ferrándiz M.J., Sanz M.J., Silva-Martin N., Hermoso J.A., de la Campa A.G.: New alkaloid antibiotics that target the DNA topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 6402-6413
- [32] Hammond G.G., Cassidy P.J., Overbye K.M.: Novobiocin-dependent topA deletion mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1991; 173: 5564-5567
- [33] Hansen G., Harrenga A., Wieland B., Schomburg D., Reinemer P. Crystal structure of full length topoisomerase I from *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.*, 2006; 358: 1328-1340
- [34] Huang F., He Z.G.: Characterization of an interplay between a *Mycobacterium tuberculosis* MazF homolog, Rv1495 and its sole DNA topoisomerase I. *Nucleic Acids Res.*, 2010; 38: 8219-8230
- [35] Huber R., Kurr M., Jannasch H.W., Stetter K.O.: A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110°C. *Nature*, 1989; 342: 833-834
- [36] Hwang Y., Park M., Fischer W.H., Burgin A.Jr., Bushman F.: DNA contacts by protein domains of the molluscum contagiosum virus type-1B topoisomerase. *Virology*, 1999; 262: 479-491
- [37] Hwang Y., Wang B., Bushman F.D.: Molluscum contagiosum virus topoisomerase: purification, activities, and response to inhibitors. *J. Virol.*, 1998; 72: 3401-3406
- [38] Jain T., Roper B.J., Grove A.: A functional type I topoisomerase from *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol. Biol.*, 2009; 10: 23
- [39] Janakiraman A., Goldberg M.B.: Recent advances on the development of bacterial poles. *Trends Microbiol.*, 2004; 12: 518-525
- [40] Keane O.M., Dorman C.J.: The gyr genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis. *Mol. Genet. Genomics*, 2003; 270: 56-65
- [41] Kelly A., Conway C., Cróinín T., Smith S.G., Dorman C.J.: DNA supercoiling and the Lrp protein determine the directionality of fim switch DNA inversion in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 2006; 188: 5356-5363
- [42] Kieser H.M., Kieser T., Hopwood D.A.: A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 5496-5507
- [43] Kois A., Świętek M., Zakrzewska-Czerwińska J.: Structure of bacterial chromosome. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 534-540
- [44] Krogh B.O., Shuman S.: A poxvirus-like type IB topoisomerase family in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 1853-1858
- [45] Labigne A., de Reuse H.: Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect. Agents Dis.*, 1996; 5: 191-202
- [46] Lesley S.A., Jovanovich S.B., Tse-Dinh Y.C., Burgess R.R.: Identification of a heat shock promoter in the topA gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1990; 172: 6871-6874
- [47] Levine C., Hiasa H., Marians K.J.: DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998; 1400: 29-43
- [48] Luijsterburg M.S., Noom M.C., Wuite G.J., Dame R.T.: The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol.*, 2006; 156: 262-272
- [49] Macvanin M., Adhya S.: Architectural organization in *E. coli* nucleoid. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1819: 830-835
- [50] McFarland K.A., Lucchini S., Hinton J.C., Dorman C.J.: The leucine-responsive regulatory protein, Lrp, activates transcription of the fim operon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium via the fimZ regulatory gene. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 602-612
- [51] Minkah N., Hwang Y., Perry K., Van Duyne G.D., Hendrickson R., Lefkowitz E.J., Hannehalli S., Bushman F.D.: Variola virus topoisomerase: DNA cleavage specificity and distribution of sites in Poxvirus genomes. *Virology*, 2007; 365: 60-69
- [52] Mirkin S.M.: DNA topology: fundamentals. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group., 2001
- [53] Mizushima T., Natori S., Sekimizu K.: Inhibition of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I activity by phospholipids. *Biochem. J.*, 1992; 285: 503-506
- [54] Murphy L.D., Zimmerman S.B.: Condensation and cohesion of lambda DNA in cell extracts and other media: implications for the structure and function of DNA in prokaryotes. *Biophys. Chem.*, 1995; 57: 71-92
- [55] Ni Bhriain N., Dorman C.J.: Isolation and characterization of a topA mutant of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.*, 1993; 7: 351-358
- [56] Niehus E., Gressmann H., Ye F., Schlapbach R., Dehio M., Dehio C., Stack A., Meyer T.F., Suerbaum S., Josenhans C.: Genome-wide analysis of transcriptional hierarchy and feedback regulation in the flagellar system of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*, 2004; 52: 947-961
- [57] Niehus E., Ye F., Suerbaum S., Josenhans C.: Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 2002; 148: 3827-3837
- [58] Nurse P., Levine C., Hassing H., Marians K.J.: Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 8653-8660
- [59] Pavlov A.R., Belova G.I., Kozyavkin S.A., Slesarev A.I.: Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 13510-13515
- [60] Perugino G., Valenti A., D'amaro A., Rossi M., Ciaramella M.: Reverse gyrase and genome stability in hyperthermophilic organisms. *Biochem. Soc. Trans.*, 2009; 37: 69-73
- [61] Peter B.J., Arsuaaga J., Breier A.M., Khodursky A.B., Brown P.O., Cozzarelli N.R.: Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.*, 2004; 5: R87
- [62] Postow L., Crisona N.J., Peter B.J., Hardy C.D., Cozzarelli N.R.: Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 8219-8226
- [63] Postow L., Hardy C.D., Arsuaaga J., Cozzarelli N.R.: Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.*, 2004; 18: 1766-1779
- [64] Pruss G.J., Manes S.H., Drlica K.: *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, 1982; 31: 35-42
- [65] Raoult D., Audic S., Robert C., Abergel C., Renesto P., Ogata H., La Scola B., Suzan M., Claverie J.M.: The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, 2004; 306: 1344-1350
- [66] Rochman M., Aviv M., Glaser G., Muskhelishvili G.: Promoter protection by a transcription factor acting as a local topological homeostat. *EMBO Rep.*, 2002; 3: 355-360
- [67] Rohde J.R., Luan X.S., Rohde H., Fox J.M., Minnich S.A.: The *Yersinia enterocolitica* pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37°C. *J. Bacteriol.*, 1999; 181: 4198-4204
- [68] Rui S., Tse-Dinh Y.C.: Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front. Biosci.*, 2003; 8: d256-d263
- [69] Sassetti C.M., Rubin E.J.: Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 12989-12994

- [70] Schneider R., Travers A., Muskhelishvili G.: The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.*, 2000; 38: 167-175
- [71] Schofield M.A., Agbunag R., Michaels M.L., Miller J.H.: Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *mutR* shows its identity to topB, encoding topoisomerase III. *J. Bacteriol.*, 1992; 174: 5168-5170
- [72] Shapiro L., McAdams H.H., Losick R.: Why and how bacteria localize proteins. *Science*, 2009; 326: 1225-1228
- [73] Sikder D., Unniraman S., Bhaduri T., Nagaraja V.: Functional cooperation between topoisomerase I and single strand DNA-binding protein. *J. Mol. Biol.*, 2001; 306: 669-679
- [74] Sinden R.R.: DNA structure and function. Academic Press. San Diego USA, 1994
- [75] Sinden R.R., Pettijohn D.E.: Chromosomes in living *Escherichia coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981; 78: 224-228
- [76] Slesarev A.I., Mezhevaya K.V., Makarova K.S., Polushin N.N., Shcherbinina O.V., Shakhova V.V., Belova G.I., Aravind L., Natale D.A., Rogozin I.B., Tatusov R.L., Wolf Y.I., Stetter K.O., Malykh A.G., Koonin E.V., Kozyavkin S.A.: The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 4644-4649
- [77] Slesarev A.I., Stetter K.O., Lake J.A., Gellert M., Krah R., Kozyavkin S.A.: DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature*, 1993; 364: 735-737
- [78] Stupina V.A., Wang J.C.: Viability of *Escherichia coli* topA mutants lacking DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 355-360
- [79] Suerbaum S.: The complex flagella of gastric *Helicobacter* species. *Trends Microbiol.*, 1995; 3: 168-170
- [80] Suerbaum S., Brauer-Steppkes T., Labigne A., Cameron B., Drlica K.: Topoisomerase I of *Helicobacter pylori*: juxtaposition with a flagellin gene (*flaB*) and functional requirement of a fourth zinc finger motif. *Gene*, 1998; 210: 151-161
- [81] Taneja B., Schnurr B., Slesarev A., Marko J.F., Mondragón A.: Topoisomerase V relaxes supercoiled DNA by a constrained swiveling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 14670-14675
- [82] Trucksis M., Michalski J., Kang Deng Y., Kaper J.B.: The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14464-14469
- [83] Tsai H.P., Lin L.W., Lai Z.Y., Wu J.Y., Chen C.E., Hwang J., Chen C.S., Lin C.M.: Immobilizing topoisomerase I on a surface plasmon resonance biosensor chip to screen for inhibitors. *J. Biomed. Sci.*, 2010; 17: 49
- [84] Viard T., Cossard R., Duguet M., de La Tour C.B.: Thermotoga maritima-*Escherichia coli* chimeric topoisomerases. Answers about involvement of the carboxyl-terminal domain in DNA topoisomerase I-mediated catalysis. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 30073-30080
- [85] Wang H., Di Gate R.J., Seeman N.C.: An RNA topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 9477-9482
- [86] Wang J.C.: Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.*, 1971; 55: 523-533
- [87] Wang J.C., Caron P.R., Kim R.A.: The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell*, 1990; 62: 403-406
- [88] Wang J.Y., Syvanen M.: DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. *Mol. Microbiol.*, 1992; 6: 1861-1866
- [89] Weinstein-Fischer D., Altuvia S.: Differential regulation of *Escherichia coli* topoisomerase I by Fis. *Mol. Microbiol.*, 2007; 63: 1131-1144
- [90] Wu H.Y., Shyy S.H., Wang J.C., Liu L.F.: Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, 1988; 53: 433-440
- [91] Yang W.: Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2010; 45: 520-534
- [92] Ye F., Brauer T., Niehus E., Drlica K., Josenhans C., Suerbaum S.: Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007; 297: 65-68
- [93] Zhang Z., Cheng B., Tse-Dinh Y.C.: Crystal structure of a covalent intermediate in DNA cleavage and rejoining by *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 6939-6944
- [94] Zhu C.X., Roche C.J., Tse-Dinh Y.C.: Effect of Mg(II) binding on the structure and activity of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 16206-16210
- [95] Zimmerman S.B.: Cooperative transitions of isolated *Escherichia coli* nucleoids: implications for the nucleoid as a cellular phase. *J. Struct. Biol.*, 2006; 153: 160-175

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.