

Warszawa, dn. 9.01.2017

Mgr Marta Kulik
Pracownia Krystalochemii
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Autoreferat rozprawy doktorskiej pod tytułem:

Interactions of aminoglycoside antibiotics with ribosomal RNA and riboswitches

Tytuł w języku polskim:

Oddziaływanie antybiotyków aminoglikozydowych z rybosomowym RNA i ryboprzełącznikami

Promotorzy:

dr hab. Joanna Trylska, prof. UW, Centrum Nowych Technologii, UW
prof. dr hab. Krzysztof Woźniak, Wydział Chemii, UW

Postępująca antybiotykooporność u bakterii stanowi bodziec do opracowywania nowych, skuteczniejszych środków do walki z infekcjami bakteryjnymi. Do tego celu niezbędne jest dokładne zbadanie oddziaływania antybiotyków z ich celami molekularnymi w komórkach bakterii. Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest jednej z najczęściej stosowanych grup antybiotyków – aminoglikozydom.

Celem mojej pracy było zidentyfikowanie mechanizmów oddziaływania aminoglikozydów z różnymi RNA oraz zaprojektowanie modyfikacji tych antybiotyków, które powodowałyby bardziej specyficzny sposób oddziaływania z receptorem i miałyby mniej działań ubocznych. W ramach pracy zbadalam trzy receptory RNA, do których wiążą się aminoglikozydy. Badania obejmowały zarówno techniki eksperymentalne, jak i obliczeniowe.

Dwie z badanych struktur występują naturalnie w rybosomach, zarówno u bakterii, jak i u człowieka. Są to region dekodujący i wiązania tRNA (tzw. miejsce A) oraz Helisa 69. Miejsce A jest głównym miejscem wiązania się aminoglikozydów u bakterii. Odgrywa ono istotną rolę w procesie odczytywania informacji o sekwencji aminokwasów tworzonego białka, zawartej w matrycowym RNA. Aminoglikozydy, przyłączone w miejscu A, powodują zakłócenie tego procesu, przez co do białka mogą zostać włączone niewłaściwe aminokwasy. W przedstawionej pracy wykonałam szczegółową analizę oddziaływań elektrostatycznych, będących głównym motorem w procesie wiązania aminoglikozydów do RNA. Dzięki zastosowaniu modelowania molekularnego i symulacji komputerowych, uwzględniających asferyczność gęstości elektronowej, wyodrębniłam grupy funkcyjne aminoglikozydów, mające kluczowe znaczenie w ich wiązaniu do miejsca A. Dzięki analizie wiązań wodorowych z cząsteczkami wody, pośredniczącymi w wiązaniach pomiędzy tymi antybiotykami a receptorem, zaproponowałam modyfikacje aminoglikozydów, mające na celu zwiększenie ich powinowactwa do receptora, czyli miejsca A.

Helisa 69, która stanowi drugie miejsce wiązania aminoglikozydów do rybosomowego RNA, znajduje się na mostku łączącym małą i dużą podjednostkę rybosomu. Związanie antybiotyku w tym miejscu wywołuje zakłócenie asocjacji podjednostek. Helisa ta stanowi zatem doskonały cel dla nowych związków antybakteryjnych, zwłaszcza syntetycznych oligonukleotydów, które wiązałyby się z Helisą 69 na zasadzie komplementarnego parowania zasad. W ramach niniejszej pracy, wykonałam badania doświadczalne oddziaływania Helisy 69 z aminoglikozydem neomycyną oraz z zaprojektowanym przeze mnie oligomerem peptydowego kwasu nukleinowego. Peptydowy kwas nukleinowy jest analogiem RNA, opartym na szkielecie poliamidowym. Doświadczenia obejmowały między innymi analizę krzywych topnienia kompleksów, dichroizm kołowy oraz pomiary kalorymetryczne. Badania wykonałam z wykorzystaniem zarówno sekwencji Helisy 69 obecnej u bakterii (z uwzględnieniem jej posttranskrypcyjnych modyfikacji pseudourydynami), jak i z odpowiednią sekwencją, występującą w ludzkich rybosomach. Wyniki badań pokazały, że oligomer peptydowego kwasu nukleinowego, połączony kowalencyjnie z peptydem ułatwiającym wnikanie do komórek, wiąże się specyficznie z bakteryjną Helisą 69 i jest w stanie zablokować translację u bakterii. Jednocześnie, związek ten nie wiąże się z Helisą 69 o sekwencji występującej u człowieka.

Trzecia struktura RNA to syntetyczny ryboprzełącznik N1. Ryboprzełącznik ten ma zdolność przyłączania aminoglikozydów, które w różny sposób zmieniają jego konformację. Umieszczony w niekodującym fragmencie matrycowego RNA, może służyć do regulowania ekspresji określonego genu, co zostało przetestowane u drożdży. W niniejszej pracy, przeprowadziłam symulacje dynamiki molekularnej ryboprzełącznika N1 z wymianą replik o różnej temperaturze. Obliczenia te obejmowały ryboprzełącznik bez ligandów oraz w kompleksach z trzema różnymi aminoglikozydami w celu wyjaśnienia ich różnego wpływu na ekspresję genów. Neomycyna oraz rybostamycyna, po związaniu się do ryboprzełącznika, hamują ekspresję genu testowanego białka. Paromomycyna, różniąca się od neomycyny tylko jedną grupą funkcyjną, wiąże się w bardzo podobny sposób, jednak nie zakłóca ekspresji genu. Dzięki przeprowadzonym symulacjom, znalazłam subtelne różnice w sieci wiązań wodorowych pomiędzy badanymi systemami, które decydują o odmiennej dynamice kompleksów. W systemie z paromomycyną, zauważyłam znaczne usztywnienie nukleotydów, położonych w sąsiedztwie miejsca wiązania.

Wyniki opisane w prezentowanej pracy pokazują w sposób szczegółowy istotne oddziaływania pomiędzy aminoglikozydami a RNA w kontekście ochrony przeciwbakteryjnej oraz kontroli ekspresji genów. Zaprojektowane związki mogą stać się podstawą do opracowania nowych antybiotyków.

Rozprawa doktorska została napisana w języku angielskim. Doświadczenia oraz część obliczeń wykonałam w Centrum Nowych Technologii oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, symulacje wykonałam w RIKEN w Japonii. Wyniki badań zostały opublikowane w postaci trzech oryginalnych artykułów naukowych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej, z których jeden wyróżniono grafiką na okładce. Kolejny artykuł jest w trakcie recenzji i ostatni jest obecnie w przygotowaniu. Wyniki pracy prezentowane były na około 30 konferencjach krajowych i międzynarodowych i zostały wyróżnione m. in. nagrodą za najlepszy referat oraz dwiema nagrodami za najlepszy poster.