



Aneta Kuroń

**Prymaza DnaG jako potencjalne miejsce docelowe
dla nowych tuberkulostatyków**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

prof. dr. hab. Jarosława Dziadka

w Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Instytutu Biologii Medycznej PAN

Badania finansowane z projektu:

*„Badania mechanizmów molekularnych na styku organizm
ludzki – patogen – czynniki środowiska (InterMolMed)”*

realizowanego w ramach Programu Operacyjnego

Innowacyjna Gospodarka, lata 2007-2013,

nr POIG.01.01.02-107/09

Polska Akademia Nauk

Instytut Biologii Medycznej w Łodzi



2014

Jedną z najstarszych, a zarazem najgroźniejszych chorób zakaźnych człowieka jest gruźlica, której czynnikiem etiologicznym są patogenne bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, zwane potocznie prątkami. Choć wydawać by się mogło, że od momentu wynalezienia pierwszych tuberkulostatyków (1944 r.), a następnie wprowadzenia do terapii kolejnych, gruźlica przestała nam zagrażać, to jednak wciąż stanowi ogromny problem zdrowotny na całym świecie. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) jedna trzecia populacji ludzkiej jest zakażona prątkiem gruźlicy, przy czym pełnoobjawowa postać choroby rozwija się u około 5-10% zakażonych. Rocznie z powodu tej choroby umiera ponad milion osób. Wysoka zachorowalność oraz śmiertelność związana jest z pojawieniem się szczepów opornych na dotychczas stosowane leki, zarówno pierwszego jak i drugiego rzutu, w tym szczepów wielolekoopornych (MDR TB), a nawet całkowicie opornych (TDR TB). Obok problemu lekooporności wśród prątków, coraz częstsze przypadki koinfekcji gruźlicy z wirusem HIV stawiają ogromne wyzwanie dla współczesnej medycyny.

Obecnie najbardziej skuteczną metodą leczenia gruźlicy jest standardowa, kombinowana terapia przeciwprątkowa, składająca się z dwóch etapów. Pierwsza faza intensywnego leczenia trwa 2 miesiące. Jej celem jest zahamowanie wzrostu i zabicie istniejących prątków. Druga faza, trwająca 4 miesiące, ma na celu eliminację latentnej formy zakażenia, co zapobiega nawrotom choroby. W przypadku prątków opornych lub wystąpienia powikłań chorobowych odbiega się od tej podstawowej terapii, sięgając po kolejne leki. Proces leczenia jest wtedy zdecydowanie dłuższy, trudniejszy, kosztowniejszy i mniej skuteczny, a przy tym bardziej obciążający organizm pacjenta.

W ostatnim czasie wiele ośrodków badawczych skupia swoją uwagę na poszukiwaniu potencjalnych miejsc docelowych dla leków, które pozwoliłyby na wprowadzenie do terapii gruźlicy nowych, skutecznych tuberkulostatyków. Liczne badania prowadzone w tym kierunku skierowane są na analizę enzymów zaangażowanych w podstawowe procesy komórkowe. W tym aspekcie, dobrym kandydatem wydaje się być, uczestnicząca w procesie replikacji DNA, mykobakteryjna prymaza DnaG. Z racji na swoją kluczową rolę w powielaniu informacji genetycznej jest ona niezbędna dla przeżycia komórek bakterii, a przy tym znacznie różni się pod względem strukturalnym od swojego

eukariotycznego odpowiednika, co dodatkowo podkreśla jej atrakcyjność jako miejsca docelowego dla nowych leków przeciwgruźliczych.

Głównym celem niniejszej pracy była biologiczna i biochemiczna charakterystyka mykobakteryjnego białka DnaG pod kątem wykorzystania go jako miejsca docelowego dla nowych tuberkulostatyków.

Prymaza to specyficzna polimeraza RNA zależna od jednoniciowego DNA (ssDNA). Jej udział w replikacji DNA związany jest z syntezą krótkich fragmentów RNA, pełniących rolę starterów. Obecność starterowych RNA, dostarczających wolnego końca 3'-hydroksylowego, jest niezbędna dla aktywności replikacyjnej polimerazy DNA, niezdolnej do syntezy DNA *de novo*. Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych zidentyfikowano białka o aktywności prymazy. Ze względu na sekwencję aminokwasową i związaną z nią budowę przestrzenną białek, prymazy można podzielić na dwa zasadnicze typy. W komórkach bakterii występuje monomeryczne białko prymazy typu DnaG, które jest kodowane przez gen *dnaG*. W jego budowie można wyróżnić trzy odrębne domeny: N-terminalną („zinc-binding”), centralną (katalityczną) oraz C-terminalną (odpowiedzialna za interakcje z innymi białkami). Zaś w komórkach eukariotycznych i archeonów obecne jest heterodimeryczne białko prymazy typu Pri, które zbudowane jest z małej (Pri1/PriS) i dużej (Pri2/PriL) podjednostki. Ta różnica strukturalna wpływa nie tylko na budowę przestrzenną tych enzymów, ale także na ich relacje z innymi białkami kompleksu replikacyjnego. Bakteryjna prymaza DnaG podczas syntezy startera oddziałuje z helikazą DnaB, natomiast podjednostki prymazy eukariotycznej tworzą wieloenzymatyczny kompleks z polimerazą DNA α i podjednostką β .

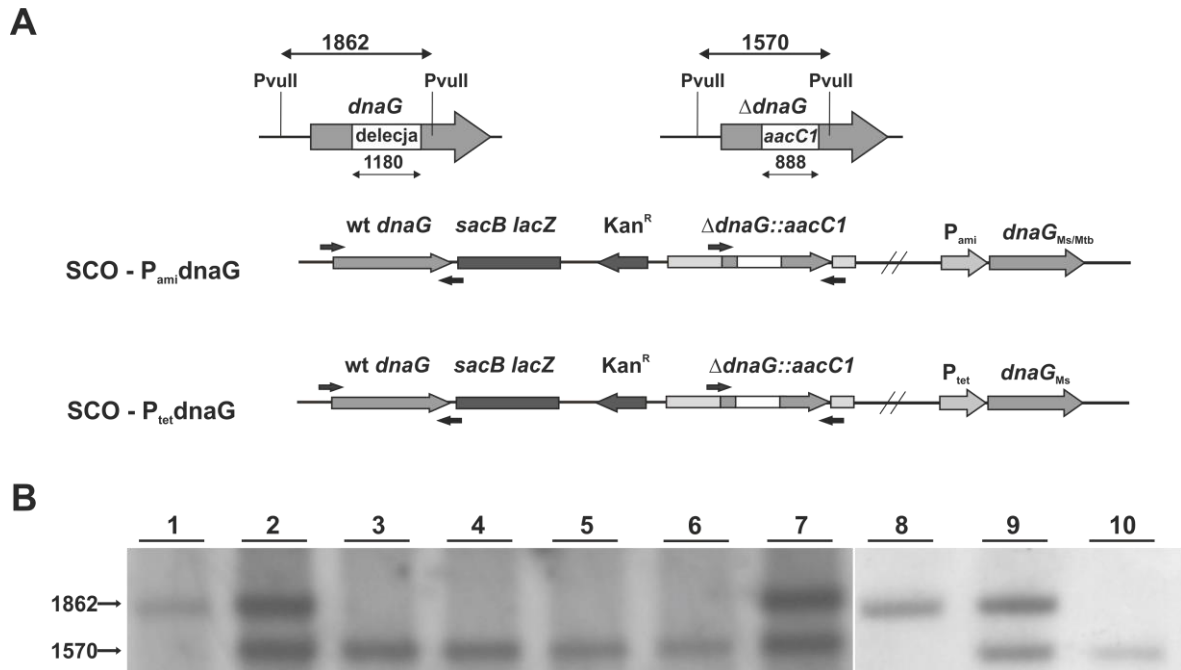
Na uwagę zasługuje również fakt, że analiza bioinformatyczna genomu prątków ujawniła obecność w komórkach tych bakterii zarówno: replikacyjnej prymazy DnaG, jak również białek blisko spokrewnionych z prymazami archaea-eukariotycznymi (AEP).

W niniejszej pracy poddano analizie niezbędność genu *dnaG* w komórkach *M. smegmatis*. W tym celu przygotowano model genetyczny oparty o proces homologicznej rekombinacji. Zastosowanie tego systemu pozwala na selekcję pojedynczych (SCO) oraz podwójnych (DCO) krzyżowych rekombinantów. W genomie mutantów SCO znajduje się chromosomalny gen *dnaG* oraz jego niefunkcjonalna kopia, zawierająca w miejscu wewnętrznej delecji gen oporności na gentamycynę, ułatwiający

selekcję potencjalnych mutantów DCO. Ponieważ prymaza DnaG jest niezbędna w komórkach bakterii, w tym mykobakterii, uzyskanie mutantów DCO zawierających jedynie inaktywowany poprzez wewnętrzną delecję gen *dnaG* jest niemożliwe.

Ponadto, w niniejszej pracy wykazano, że w przeciwieństwie do genu *dnaG*, możliwe jest usunięcie funkcjonalnej kopii genów kodujących prymazy z rodziny AEP (Prim2, Prim3, Prim4 i LigD). Przy użyciu wyżej przedstawionej metodologii otrzymano szereg mutantów *M. smegmatis*, w których została wyłączona funkcja pojedynczych genów oraz kilku genów jednocześnie. Uzyskane wyniki wskazują, że mykobakteryjne prymazy z rodziny AEP nie są niezbędne dla wzrostu tych bakterii w warunkach *in vitro*.

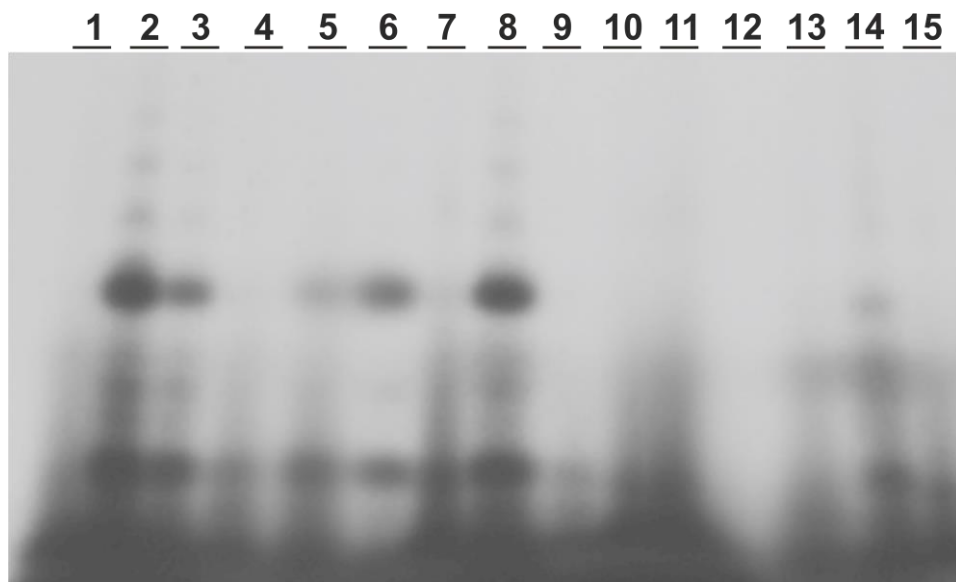
W celu dodatkowej weryfikacji niezbędności genu *dnaG* w komórkach prątków zbadano możliwość zastąpienia mykobakteryjnej prymazy DnaG przez prymazę DnaG z *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* i *E. coli* oraz przez mykobakteryjne prymazy AEP w warunkach ich nadprodukcji. W tym celu analizowane geny wklonowano do plazmidu integracyjnego posiadającego chemicznie regulowany promotor acetamidowy lub tetracyklinowy (P_{ami}/P_{tet}), który wprowadzono w miejsce *attB* chromosomu komórek mutantu SCO $\Delta dnaG$. Jedynie nadprodukcja mykobakteryjnych prymaz DnaG pozwoliła na uzyskanie warunkowych mutantów DCO, w których funkcja zmutowanej kopii genu *dnaG* została zastąpiona przez funkcjonalny gen, wprowadzony na plazmidzie integracyjnym (Ryc. 1.). Fakt, że nie uzyskano mutantów, w których zmutowana kopia mykobakteryjnego genu *dnaG*, została zastąpiona przez homologiczny gen z *E. coli* sugeruje, że białka z tych dwóch różnych organizmów mogą różnić się aktywnością i/lub oddziaływaniem z innymi białkami kompleksu replikacyjnego. Ponadto przeprowadzono próbę wymiany integrującego w miejsce *attB* plazmidu pMV306Hyg^R, zawierającego gen *dnaG*, na „pusty” plazmid pMV306Km^R. Brak kanamycynoopornych rekombinantów, nie posiadających funkcjonalnej kopii genu *dnaG* dodatkowo potwierdził niezbędność prymazy DnaG dla przeżycia *M. smegmatis*.



Rycina 1. Potwierdzenie genotypu warunkowych mutantów *M. smegmatis*. **(A)** Graficzny schemat restrykcyjnego trawienia DNA enzymem PvuII. **(B)** Analiza Southern blot na matrycy chromosomalnego DNA szczepów: *M. smegmatis* mc²155 (ścieżka 1 i 8); mutantu *dnaG/ΔdnaG::Gm^R* (ścieżka 2 i 9); mutantu *ΔdnaG-P_{ami}dnaG_{Ms}pMV306Hyg* (ścieżka 3 i 4); mutantu *ΔdnaG-P_{ami}dnaG_{Mt}pMV306Hyg* (ścieżka 5 i 6); mutantu *ΔdnaG-P_{tet}dnaG_{Ms}pKW08Lx-Int* (ścieżka 10) [Kuron A i wsp., 2014].

W dalszym etapie badań, w celu wykazania aktywności enzymatycznej mykobakteryjnej prymazy DnaG konieczne było oczyszczenie tego białka. Realizacja tego zadania wymagała przygotowania wektorów ekspresyjnych pHIS oraz pGEX-6P-2 noszących odpowiednio gen *dnaG_{Ms}* oraz *dnaG_{Mt}* i wprowadzenia ich do komórek gospodarza (*E. coli* BL21 DE3). Następnie opracowano warunki wydajnej nadprodukcji tych białek i z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, oczyszczono rekombinowane białka prymazy DnaG z *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Oczyszczone białko DnaG_{Ms} zostało dodatkowo wykorzystane do immunizacji królika, w celu uzyskania poliklonalnych przeciwciał anty-DnaG. Przy wykorzystaniu tych przeciwciał określono minimalny poziom białka DnaG wymagany do efektywnego wzrostu i przeżywalności komórek prątków. W tym celu wykorzystano, skonstruowanego we wcześniejszych etapach niniejszej pracy, warunkowego mutantu z regulowaną ekspresją mykobakteryjnej prymazy DnaG.

Aktywność obu rekombinowanych białek została zweryfikowana w teście *in vitro* z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanego substratu ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$). Wstępne badania aktywności enzymatycznej wykazały, że mykobakteryjna prymaza DnaG, w obecności jonów Mg^{2+} , do swej aktywności wymaga matrycy ssDNA o innym składzie nukleotydowym niż prymaza DnaG z *E. coli*. Dlatego też, w dalszych badaniach określono minimalną długość tej matrycy oraz zidentyfikowano specyficzną sekwencję (5'-TACTCTCATCGTGGA/CA), od której mykobakteryjna prymaza DnaG rozpoczyna syntezę startera RNA (Ryc. 2.). Ponadto wykazano, że w obecności innych jonów dwuwartościowych – Mn^{2+} - znacznie zwiększa się wydajność reakcji syntezy RNA, a dodatkowo znoszona jest specyficzność enzymu względem sekwencji starterowej matrycy.

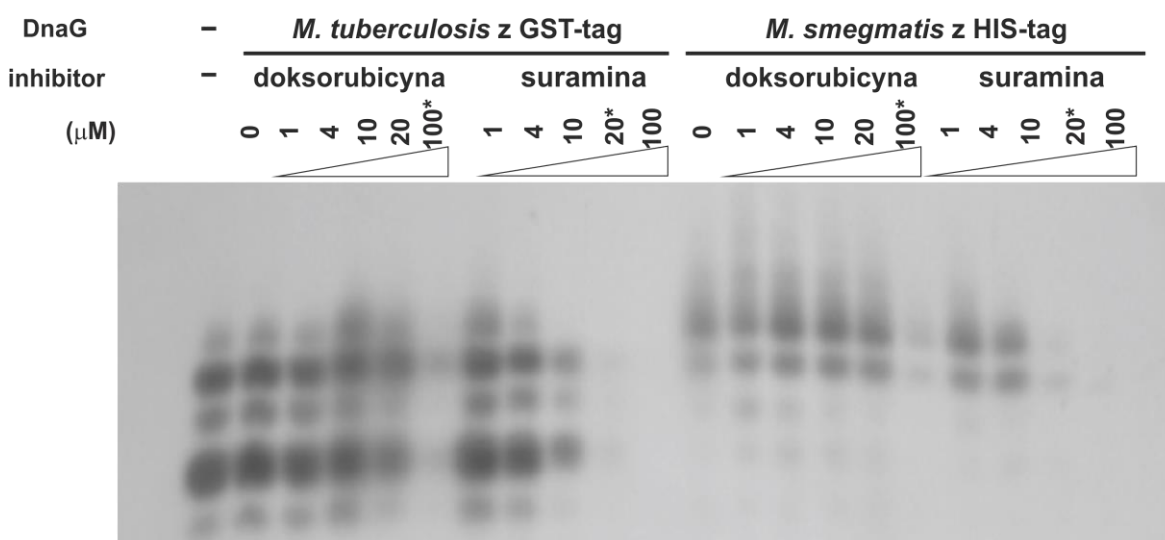


Rycina 2. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji syntezy startera przez prymazę DnaG na różnych matrycach w obecności jonów magnezu. Analiza sekwencji konsensusowej. **(1)** kontrola negatywna bez białka (SLIC64); **(2)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16); **(3)** DnaG_{Mt}GST (SLIC15); **(4)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-16G); **(5)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-16T); **(6)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-16C); **(7)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-15T), **(8)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-15C); **(9)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-15G), **(10)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-14A), **(11)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-14T); **(12)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-14C), **(13)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-13A), **(14)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-13T); **(15)** DnaG_{Mt}GST (SLIC16-13C).

Z wykorzystaniem techniki EMSA potwierdzono oddziaływanie mykobakteryjnej prymazy DnaG z jednoniciowym DNA. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że siła tego oddziaływania jest zależna zarówno od długości, jak i sekwencji nukleotydowej matrycy DNA.

Badaniu poddano również wpływ doksorubicyny i suraminy na aktywność enzymatyczną mykobakteryjnych prymaz DnaG oraz na wzrost szczepów mykobakterii.

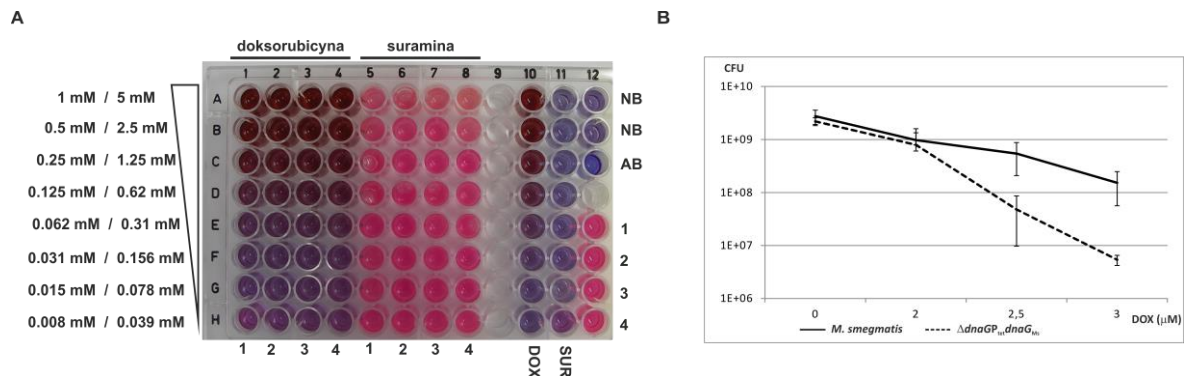
Do badań *in vitro* wykorzystano opracowany test aktywności enzymatycznej. Zarówno doksorubicyna jak i suramina w niskich stężeniach działają hamująco na aktywność obu mykobakteryjnych białek DnaG. Analiza wykazała, że doksorubicyna hamuje aktywność białek przy stężeniu 100 μM , zaś suramina przy stężeniu 20 μM (Ryc. 3.).



Rycina 3. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji syntezy startera przez prymazę DnaG_{Mt}GST oraz DnaG_{Ms}HIS na 24-nukleotydowej matrycy ssDNA (SLIC24) w obecności jonów manganu oraz związków: doksorubicyny i suraminy [Kuron A i wsp., 2014].

Uzyskane z analiz *in vitro* wyniki poddano weryfikacji w warunkach *in vivo*. Ocenie wrażliwości na badane związki poddano dziki szczep *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* oraz skonstruowane szczepy warunkowych mutantów. W przypadku wszystkich analizowanych szczepów doksorubicyna efektywnie hamowała ich wzrost przy stosunkowo niskim stężeniu tego związku. Na uwagę zasługuje również fakt, że warunkowy mutant mający obniżony poziom białka DnaG w komórce wykazywał zwiększoną wrażliwość na doksorubicynę w porównaniu do dzikiego szczepu *M. smegmatis*. Niestety, pomimo iż

suramina silniej niż doksorubicyna hamowała aktywność oczyszczonych białek, to nie obserwowano hamującego działania tego związku na wzrost mykobakterii (Ryc. 4.).



Rycina 4. Hamujący efekt działania doksorubicyny na dziki szczep *M. smegmatis* oraz warunkowe mutanty. **(A)** MABA - naliza przeżywalności szczepów: *M. smegmatis* mc²155 **(1)**, $\Delta dnaG$ -P_{ami}*dnaG*_{Mt} **(2)**, $\Delta dnaG$ -P_{ami}*dnaG*_{MS} **(3)** i $\Delta dnaG$ -P_{tet}*dnaG*_{MS} **(4)**, w obecności różnych stężeń doksorubicyny (DOX) i suraminy (SUR); NB – kontrola podłoża NB; AB – kontrola odczynnika alamarBlue. **(B)** Analiza 24-ro godzinnej hodowli szczepów *M. smegmatis* mc²155 oraz $\Delta dnaGP_{tet} dnaG_{MS}$ na płynnym podłożu NB w zależności od użytego stężenia doksorubicyny. Wzrost monitorowano na podstawie liczby jednostek tworzących kolonie (c.f.u.).

Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że:

- prymaza DnaG jest niezbędna do wzrostu mykobakterii i nie może być zastąpiona przez obecne w komórkach prymazy z rodziny AEP, nawet w warunkach ich nadprodukcji;
- zastosowanie mykobakteryjnej prymazy DnaG jako potencjalnej tarczy docelowej dla nowych leków przeciwgruźliczych musi uwzględniać niską wrażliwość komórek mykobakterii na znaczne obniżenie poziomu tego enzymu w komórce;
- selekcja potencjalnych inhibitorów prymazy DnaG w warunkach *in vitro* musi podlegać weryfikacji w układzie *in vivo*, ze względu na selektywną barierę przepuszczalności, jaką stanowi ściana komórkowa prątków;
- w obecności jonów Mg²⁺ rozpoczęcie syntezy startera przez mykobakterijną prymazę DnaG wymaga specyficznej sekwencji nukleotydowej dostępnej na matrycy jednoniciowego DNA; zależność od sekwencji matrycy przestaje mieć znaczenie w obecności jonów Mn²⁺.

Uzyskane wyniki potwierdzają atrakcyjność mykobakteryjnej prymazy DnaG jako potencjalnego miejsca docelowego dla nowych leków przeciwgruźliczych.