

Chapter 8

Streszczenie

Mycobacteriu tuberculosis (*Mtb*) jest wciąż jednym z najgroźniejszych, bakteryjnych patogenów człowieka będącym czynnikiem etiologicznym gruźlicy. W związku z niewielką liczbą skutecznych tuberkulostatyków oraz koniecznością stosowania w terapii kilku leków równocześnie, niezbędne jest poszukiwanie nowych leków przeciwpłatkowych oraz nowych tarcz molekularnych pozwalających na ukierunkowane poszukiwanie ich inhibitorów. Charakterystyczny skład bogatych w lipidy osłon komórkowych i zdolność *Mtb* do przejścia od aktywnego wzrostu do stanu latentnego są dwoma głównymi wyzwaniem w poszukiwaniu nowych leków przeciwpłatkowych.

Fosfolipidy błonowe (PL) *Mtb* obejmują takie związki jak: fosfatydyloglicerol (PG), kardiolipinę (CL), fosfatydyloinozytol (PI) i jego mannozytowe pochodne oraz zasadową fosfatydyloetanolaminę (PE). W niniejszych badaniach u *Mtb* H37Rv wykazano obecność dodatkowego zasadowego fosfolipidu, który zidentyfikowano jako fosfatydyloglicerol (L-PG) podstawiony dodatkowo lizyną. Białko odpowiedzialne za powstawanie tego związku kodowane jest przez gen *lysX*

kodujący dwie domeny białkowe lizyl- transferazy (MprF) i lizyl- tRNA syntetazy (LysU). Mutant *Mtb* Δ *lysX* pozbawiony zdolności do syntezy L-PG charakteryzował się zwiększoną wrażliwością na kationowe antybiotyki i peptydy, wykazywał zmieniony potencjał błonowy w porównaniu do szczepu dzikiego oraz nieefektywnie blokował fuzję fago- i lizosomów w infekowanych makrofagach. Mutant Δ *lysX* wykazywał również upośledzony wzrost w płucach myszy i świnek morskich, co sugeruje, że aktywność LysX jest niezbędna dla pełnej wirulencji *Mtb*. Szczep mutanta Δ *lysX* poddany komplementacji natywną kopią genu *lysX*, ale nie szczep komplementowany jedynie domeną *mprF*, odzyskał zdolność do produkcji L-PG i związany z tym fenotyp szczepu dzikiego. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały, że dla aktywności LysX wymagana jest ekspresja obu domen.

Dla oceny korelacji między zmianami potencjału błonowego i aktywnością LysX, wyznakowano CL błony komórkowej prątków stosując fluorescencyjny barwnik (NAO). Stwierdzono, że CL były zlokalizowane w osłonach komórkowych w rejonie przegrody i na biegunach aktywnie dzielących się komórek, ale nie komórek będących w stacjonarnej fazie wzrostu. Komórki mutanta Δ *lysX*, w porównaniu ze szczepem dzikim, były wydłużone i wykazywały liczniejsze i jaśniejsze plamy CL zarówno w rejonie przegrody powstającej w części środkowej jak i w 1/4 długości komórki. Powyższe obserwacje wskazują na zaburzenia w procesie podziału komórkowego mutanta Δ *lysX*. Ocena inkorporacji ^{14}C kwasu

octowego do głównych PL, takich jak CL, PE, PI przez mutantą wykazała zaburzenia w syntezie PE i PI, ale nie CL.

Dalsze barwienia lipidów osłon komórkowych prątków wykazały, że komórki z defektywną syntezą przegrody komórkowej nie wykazują obecności regionów wzbogaconych w CL. Wykorzystanie termowrażliwego mutantą DnaA i zastosowanie jego zsynchronizowanej hodowli wykazało współlokalizację białka inicjacji replikacji z regionami wzbogaconymi w CL w błonie komórkowej, co sugeruje, że białko to może wchodzić w interakcje z CL.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że aktywność LysX wymagana jest w odpowiedzi na działanie kationowych związków przeciwbakteryjnych i prezentacji pełnej wirulencji prątków na modelu mysim. Ponieważ poziom transkrypcji *lysX* jest podwyższony w warunkach *in vivo*, wysnuto wniosek, że optymalny wzrost *M. tuberculosis* podczas zakażenia wymaga podwyższonego poziomu ekspresji *lysX*. Podwyższony poziom ekspresji *lysX* zapewniono poprzez komplementację mutantą nienaruszoną kopią genu *lysX* pod ekspresją promotora *tet*.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwoliły na trzy główne i prawdopodobnie powiązane ze sobą obserwacje. Po pierwsze, wykryto obecność regionów wzbogaconych w CL w połowie długości komórek i na biegunach aktywnie dzielących się komórek prątków, ale nie w komórkach w fazie stacjonarnej. Po drugie, w szczepie mutantą

Δ lysX metabolizm PE i PI, ale nie CL, znacznie różni się od typu dzikiego. Po trzeciej, komórki mutantu *lysX* są wydłużone, co wskazuje na upośledzenie procesu podziału komórkowego. Warto nadmienić, że u innych gatunków bakterii odnotowano podobieństwa w lokalizacji CL w pobliżu biegunów komórki pozbawionych nukleoidu i powstającej przegrody komórkowej. Co więcej wykazano, że mutacje w obrębie genów wpływających na metabolizm fosfolipidów prowadzą do opóźnienia podziału komórkowego i powstawania filamentów komórek. Tak więc jest prawdopodobne, że u prątków lokalizacja CL, i ewentualnie innych PL, w okolicy przegrody i podział komórek są ze sobą powiązane. Przypuszczalnie kontrolowany obieg PL jest konieczny dla regulacji cyklu komórkowego i utrzymania potencjału błonowego niezbędnego do namnażania *Mtb* podczas infekcji. Wiadomo, że PG jest gromadzony w wyniku katabolizmu CL. Przypuszczalnie optymalny proces podstawiania PG lizyną za pośrednictwem LysX i krok odszczepiania lizyny przeprowadzany przez niezidentyfikowane dotychczas enzymy, mogą modulować stan błony lipidowej, co może z kolei wpływać na potencjał błony i podział komórkowy. Ponadto wiadomo, że złożone, bogate w lipidy osłony komórkowe *Mtb* umożliwiają patogenowi odparcie mechanizmów obronnych gospodarza.

PL *Mtb* wykazują znaną funkcję modulatorów odporności. Są uwalniane w trakcie wewnątrzkomórkowego wzrostu i transportowane

do lizosomów, prawdopodobnie aby modulować ich funkcje. W związku z powyższym, można przewidzieć, że zmiany w obiegu PL wpływają na zdolność PL do funkcjonowania jako skuteczne modulatory odporności, co z kolei może wpływać na przeżywalność *Mtb* podczas infekcji. Szczegółowe badania metabolizmu PL mutantów $\Delta lysX$ i roli białka LysX w procesie podziału komórkowego mogą dostarczyć cennych wskazówek na temat roli aktywności LysX w proliferacji *Mtb* podczas zakażenia.

Barwienie NAO jest użyteczną metodą badań cyklu komórkowego, jako marker tworzenia przegrody i podziału komórek; wykazano, że metoda ta jest szczególnie użyteczna w badaniu synchronicznych populacji komórek *Mtb*. Zaobserwowano lokalizację DnaA i CL w podobnych regionach błony komórkowej, chociaż konieczne są dalsze badania, by wykazać ich ko-lokalizację i odpowiedzieć na pytanie, kiedy takie interakcje mogłyby występować. Zastosowane techniki barwienia mogą prowadzić do lepszego zrozumienia zdarzeń podczas cyklu komórkowego, w szczególności wydarzeń związanych ze zdolnością *Mtb* do przechodzenia w fazę latentną, a następnie ponowną reaktywację.

W podsumowaniu, uzyskane wyniki sugerują, że LysX- zależna produkcja L-PG jest niezbędna dla utrzymania optymalnej integralności błony i dla przetrwania patogenu podczas infekcji. Uzyskane wyniki podtrzymują również hipotezę, że zmiany w metabolizmie PL mogą przyczyniać się do zmiany potencjału błonowego, stąd obserwowany fenotyp mutantu $\Delta lysX$.

Ponadto organizacja i lokalizacja PL mogą wskazywać na interakcje białek cyklu komórkowego z domenami lipidów i określać funkcje tych białek.

Bibliografia

1. Doolittle R. (2001) *Myosins: a new family of cytoskeletal proteins*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 1-26.
2. Tachibana M, Kuroki H, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
3. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
4. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
5. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
6. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
7. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
8. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
9. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
10. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
11. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
12. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
13. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.
14. Kuroki H, Tachibana M, Uemura T, et al. (1997) *Myosin VIIA is a member of the class II myosin family*. *Journal of Cell Biology* 137: 111-121.