

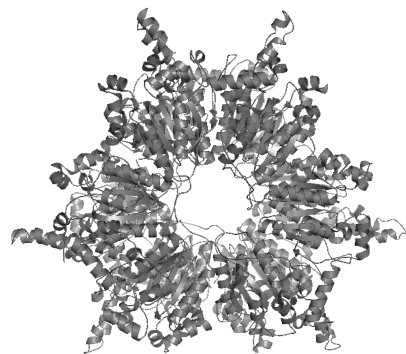
rozprawa doktorska

**Rola białka AccD6 jako
karboksylotransferazy aktywnej w
biosyntezie kwasów mykolinowych
prątków wolno i szybko rosnących**

JAKUB PAWEŁCZYK



**INSTYTUT
BIOLOGII
MEDYCZNEJ
PAN
Łódź, 2014**



promotor pracy:

prof. dr hab. Jarosław Dziadek

STRESZCZENIE

Malonylo-CoA jest głównym, dwuwęglowym prekursorem syntezy kwasów mykolinowych jak też innych kwasów tłuszczowych *M. tuberculosis*. Wytwarzany jest w komórce na drodze karboksylacji acetylo-CoA w dwuetapowej reakcji katalizowanej przez karboksylazę acetylo-CoA i włączany do rosnącego acylu w cyklicznym procesie, kontrolowanym przez zespoły syntaz kwasów tłuszczowych - FAS-I/FAS-II.

Każda z dwóch reakcji składowych procesu karboksylacji katalizowana jest przez zlokalizowaną na osobnym polipeptydzie podjednostkę enzymu: karboksylazę biotyny (podjednostka α) oraz karboksylotransferazę (podjednostka β). Ze względu na fakt, iż to podjednostka β odpowiada za specyfikę substratową holoenzymu, charakterystyka mykobakteryjnych karboksylotransferaz oraz kodujących je genów wydaje się kluczem do poznania mechanizmu wytwarzania malonylo-CoA jak też innych prekursorów biosyntezy lipidów *M. tuberculosis*.

Głównym celem niniejszej pracy było potwierdzenie funkcji białka AccD6 jako podjednostki karboksylazy acetylo-CoA aktywnej w procesie biosyntezy kwasów mykolinowych *Mycobacterium*, odpowiedzialnej za syntezę malonylo-CoA.

Wykorzystując ukierunkowaną mutagenezę oraz analizę fenotypu uzyskanych mutantów dowiedziono *in vivo*, iż gen *accD6* (Rv2247) koduje niezbędną do przeżycia drobnoustroju karboksylotransferazę, stanowiącą podjednostkę enzymu katalizującego syntezę malonylo-CoA w komórce prątka gruźlicy. Zaskakująco, analizy przeprowadzone równoległe na niepatogennym szczepie prątka *M. smegmatis* wykazały, iż homolog *accD6* (MSMEG_4329), pomimo kodowania białka o tej samej funkcji, może zostać wyłączony bez wpływu na ilościowy i jakościowy skład kwasów mykolinowych oraz innych lipidów komórki mutantu. W celu identyfikacji alternatywnej podjednostki β karboksylazy acetylo-CoA w komórce *M. smegmatis*, ocenie zaangażowania w proces biosyntezy kwasów mykolinowych poddano pozostałe pięć genów kodujących potencjalne karboksylotransferazy. Jedynie dwa geny (MSMEG_6391 i MSMEG_1813) okazały się niezbędne do przeżycia komórki *M. smegmatis*. Poprzez konstrukcję mutantów warunkowych oraz odpowiednich szczepów komplementowanych udowodniono, iż funkcję alternatywnej karboksylotransferazy acetylo-CoA *M. smegmatis* posiada białko MSMEG_1813, będące homologiem AccD5 *M. tuberculosis*. Ponieważ badania na modelu *M. tuberculosis* wykazały, iż białko AccD5 tego gatunku nie jest zdolne do podjęcia

funkcji karboksylotransferazy acetylo-CoA udowodniono, iż różnica w możliwości inaktywacji genu *accD6* między patogennym i saprofitycznym szczepem *Mycobacterium* tkwi w odmiennej specyfice substratowej białka AccD5 wspomnianych gatunków.

Wykazano, iż poza różnicą w znaczeniu dla przeżycia komórki, *accD6* podlega także odmiennej regulacji ekspresji w szczepach patogennym i saprofitycznym, co może sugerować, iż rola AccD6 *M. tuberculosis* nie ogranicza się jedynie do syntezy substratu w cyklu FAS-I/FAS-II lecz obejmuje także inne szlaki biosyntezy lipidów.

Wyniki opisane w niniejszej pracy pozwoliły na usystematyzowanie wiedzy na temat zaangażowania poszczególnych białek z rodziny AccD w proces biosyntezy kwasów mykolinowych oraz ostatecznie potwierdziły, iż AccD6 jest jedynym białkiem *M. tuberculosis* zdolnym do katalizy, kluczowej dla przeżycia komórki, reakcji transferu grupy karboksylowej na acetylo-CoA.

Zdobyta wiedza stanowi pierwszy krok na drodze do identyfikacji skutecznej metody hamowania biosyntezy lipidów prątka gruźlicy poprzez bezpośrednie blokowanie aktywności białka AccD6.