

# Streszczenie

Wywoływana przez bakterię *Mycobacterium tuberculosis* gruźlica, to choroba, która co roku powoduje śmierć około dwóch milionów ludzi na całym świecie (raport WHO, 2009). Pomimo, że skuteczna walka z tą chorobą rozpoczęła się wiele dekad wcześniej wraz z wynalezieniem pierwszego przeciwgruźliczego antybiotyku – streptomycyny, to dane statystyczne nie dają powodów do optymizmu. Na domiar złego, w ostatnich latach obserwuje się dodatkowo pojawianie się szczepów opornych na kilka lub nawet wszystkie klasycznie stosowane leki przeciwgruźlicze. Za sukces *Mycobacterium tuberculosis* jako patogenu uznawana jest powszechnie jego zdolność do precyzyjnego regulowania procesu namnażania się podczas rozwoju i przebiegu infekcji. Bakteria ta jest zdolna przetrwać wiele lat w stanie utajonego – latentnego zakażenia, podczas którego nie namnaża się, lub namnaża się w powolnym tempie. Niestety, prątki gruźlicy są w stanie wykorzystać moment czasowego obniżenia aktywności systemu immunologicznego gospodarza i zaczynają się intensywnie namnażać powodując nawrót pełnoobjawowej choroby. Drugim niesłychanie ważnym czynnikiem odpowiadającym za zjadliwość patogennych mykobakterii jest niezwykle ściana komórkowa, niespotykana u innych bakterii. Dzięki swoim unikalnym właściwościom jest ona w stanie ochronić prątki gruźlicy przed niesprzyjającymi warunkami bytowania we wnętrzu organizmu ludzkiego, jak na przykład przed kwaśnym środowiskiem fagosomu do którego prątki dostają się po wchłonięciu przez makrofagi alweolarne płuc. Z drugiej strony, elementy ściany komórkowej prątków takie jak glikolipidy, woski czy osłonka komórkowa są w stanie wpływać na układ odpornościowy gospodarza, modulując typ odpowiedzi immunologicznej i pozwalając na unikanie mechanizmów obronnych gospodarza. Ściana komórkowa mykobakterii pozostaje również w dużym stopniu nie przepuszczalna dla większości stosowanych w medycynie leków przeciwbakteryjnych, obniżając szansę na szybkie i efektywne zwalczenie zakażenia.

Synteza ściany komórkowej od lat była bardzo atrakcyjnym procesem dla poszukiwania skutecznych leków przeciwbakteryjnych, głównie ze względu na jego znaczenie dla przeżywania drobnoustrojów w środowisku i w organizmie człowieka. Leki hamujące syntezę elementów ściany komórkowej pozostają w grupie najskuteczniejszych, nie

.....

mniej jednak wykazują one obniżoną aktywność wobec mikroorganizmów wolnorosnących, jak *M. tuberculosis*. Istnieją nawet przypuszczenia, że jeśli udałoby się przyspieszyć tempo namnażania się prątków wiele dostępnych obecnie leków stało by się potencjalnie o wiele bardziej aktywnych w walce z gruźlicą. Powolny wzrost i fakt, że prątki gruźlicy ograniczają syntezę nowej ściany komórkowej jedynie do dwóch regionów w komórce – przegrody podziałowej oraz końców komórki, wpływają na limitowaną skuteczność stosowanych leków. Podział komórki i związane z nim wytwarzanie ściany komórkowej są procesami niezbędnymi dla przetrwania i namnażania się bakterii i upatrywane są jako potencjalne tarcze dla nowych leków przeciwprątkowych.

Podział komórki prątków następuje podczas cyklu komórkowego zaraz po replikacji chromosomu bakteryjnego i częściowo zazębia się z jego segregacją do przeciwległych biegunów komórki. Proces tworzenia przegrody podziałowej jest możliwy dzięki białku FtsZ, które należy do dynamicznych elementów cytoszkieletu bakteryjnego i ma własności GTPazy. Białko FtsZ jest zdolne do tworzenia pierścienia podziałowego, umiejscawianego w centrum komórki gotowej do podziału, dzięki działaniu skomplikowanych mechanizmów regulacyjnych. Do powstającego pierścienia podziałowego przyłącza się kolejno kilkanaście innych białek w celu zsyntetyzowania ściany poprzecznej, a następnie rozdzielenia nowopowstałych komórek potomnych poprzez hydrolizę nadmiaru ściany komórkowej pomiędzy nimi. Współistnienie dwóch przeciwstawnych procesów – syntezy i hydrolizy ściany komórkowej wymaga ścisłego skoordynowania tych procesów, stąd białka wchodzące w skład kompleksu podziałowego są rekrutowane w odpowiedniej kolejności. Jakikolwiek zaburzenia tego procesu powodowałyby bowiem niezdolność komórek bakteryjnych do namnażania się a często nawet śmierć komórki poprzez lizę.

W prezentowanej pracy skoncentrowano się na określeniu roli białka Rv0011c, będącego homologiem białka CrgA, niedawno opisanego u *Streptomyces coelicolor* jako białko zaangażowane w regulację i przebieg podziału komórki. CrgA jako małe, przez błonowe białko zostało uznane za potencjalny inhibitor podziału komórki u *S. coelicolor* negatywnie oddziałując na stabilność białka FtsZ. Z drugiej strony okazało się ono absolutnie niezbędne w przebiegu podziału komórki blisko spokrewnionego *S. arvemitilis*. Pomimo dwóch tak skrajnych wyników z bardzo blisko spokrewnionych ze sobą bakterii, w obydwu przypadkach CrgA zostało w pośredni lub bezpośredni sposób powiązane z mechanizmami podziału komórkowego przebiegającego z udziałem białka FtsZ. Nie określono jego roli w alternatywnej drodze rozmnażania się tych promieniowców poprzez

fragmentację komórki - strzępki. Gen kodujący CrgA znajduje się na chromosomie prątków gruźlicy w bezpośrednim sąsiedztwie klastru genów regulujących kształt komórki i uczestniczących w procesie podziału komórki, zawierającego między innymi: FtsZ interacting protein A (*fipA*, *rv0019c*), RodA (*rv0017c*), PbpA (*rv0016c*), kinazy serynowo-treoninowe PknA (*rv0015c*) i PknB (*rv0014c*). Przypuszcza się, że geny znajdujące się w swoim pobliżu na genomie mogą potencjalnie być odpowiedzialne za te same procesy, co wspiera hipotezę o możliwym zaangażowaniu CrgA w procesy tworzenia przegrody podziałowej.

Dzięki zastosowaniu szeregu różnorodnych technik z pogranicza biologii molekularnej, genetyki i biochemii, w prezentowanej pracy dokonano analizy funkcji homologa CrgA w komórkach *Mycobacterium tuberculosis*. W celu zrealizowania założeń projektu skonstruowano szczepy charakteryzujące się zmienionym poziomem białka CrgA. Określono także ilość molekuł tego białka przypadających na każdą komórkę prątka jako około 20,000 cząsteczek. Oznacza to, że białko CrgA jest dość liczne w komórce, w porównaniu na przykład z innym białkiem zaangażowanym w podział komórki – FtsQ, którego liczebność określa się jako mniej niż 100 na każdą komórkę bakteryjną. W pracy przeanalizowano następnie tempo wzrostu, morfologię i długość komórek, które mają zmienione ilości białka CrgA w komórce. Okazało się, że 4,5-krotna nadprodukcja CrgA, w fazie logarytmicznego wzrostu, powodowała jedynie nieznaczne przyspieszenie częstotliwości podziału komórek prątków bez zmiany ich morfologii. Zmniejszenie poziomu badanego białka o ~33% poprzez wyciszenie ekspresji przy użyciu antysensowego mRNA, powodowało drastyczne zwolnienie tempa wzrostu komórek przy jednoczesnym ich wydłużeniu średnio o 36% względem szczepu dzikiego. Dla powyższych szczepów przebadano także tworzenie błony komórkowej pomiędzy dzielącymi się komórkami przy użyciu barwienia z FM4-64. Szczep dziki nie różnił się od nadprodukującego CrgA w którym stwierdzono ~13% komórek posiadających błonę komórkową w centrum komórki. Dla szczepu z obniżonym poziomem badanego białka zaobserwowano zwiększoną częstość występowania błony międzykomórkowej tj. u ~18% komórek, jednocześnie odnotowano jednak dużą populację długich komórek, które normalnie powinny były przejść podział komórkowy, bez widocznej przegrody.

Podobne wyniki liczbowe zaobserwowano przy zastosowaniu barwienia komórek przy pomocy fluorescencyjnej vankomycyny. O ile H37Rv posiadał sygnał fluorescencyjny na środku komórki u ~14,5% komórek, a szczep z obniżonym poziomem CrgA u aż 19,5% komórek, to szczep nadprodukujący CrgA wykazywał obecność fluorescencyjnego barwnika

.....

jedynie u około 9% komórek. Korzystając z dostępności w laboratorium fluorescencyjnego analogu ramoplaniny, po raz pierwszy uwidoczono miejsca pierwotnej syntezy peptydoglikanu w komórkach *M. tuberculosis* w alternatywny sposób. Ramoplanina jest bowiem w stanie wiązać nie tylko zaangażowane w syntezę peptydoglikanu białko murG ale także podjednostki syntezy peptydoglikanu – lipidu I oraz lipidu II.

Następnie, postanowiono uwidocznić wewnątrzkomórkową lokalizację białka CrgA poprzez dokonanie jego fuzji z białkiem jasnoniebieskiej fluorescencji (CFP). Niestety ze względu na konieczność zastosowania specjalnych środków ostrożności przy pracy z patogennymi prątkami gruźlicy nie udało się uzyskać zdjęć mikroskopowych o odpowiedniej jakości, stąd zdecydowano o wykorzystaniu gospodarza zastępczego – *Mycobacterium smegmatis*. Było to zasadne także ze względu na wysoki procent homologii między CrgA z obydwu gatunków, sięgający 81%. ECFP-CrgA lokalizowało do przegrody komórkowej w przypadku ~13% komórek i do końców komórek w przypadku 18% populacji bakterii. Często było widoczne na końcach dwóch komórek, tuż przed ich ostatecznym rozdzieleniem, stąd wywnioskowano, iż obserwowana polarna lokalizacja ECFP-CrgA jest wynikiem niedawno zakończonego podziału komórkowego. Obserwowane położenie analizowanego białka w centrum komórki było całkowicie zależne od obecności w komórce białka FtsZ. W przypadku szczepu z obniżonym poziomem FtsZ, CrgA nie było w stanie lokalizować do centrum komórki. Z drugiej strony przy jednoczesnej ekspresji ECFP-CrgA wraz z FtsZ w fuzji z białkiem żółtej fluorescencji wykazano, iż obydwa białka znajdują się w centrum komórek w tym samym miejscu i czasie. Dodatkowo, przy zastosowaniu specjalnie skonstruowanych skróconych form białka CrgA ustalono, że to jego cytoplazmatyczna, N-końcowa domena jest odpowiedzialna za specyficzne pozycjonowanie w komórce.

Dzięki zastosowaniu technik chromatografii powinowactwa wykazano istnienie bezpośrednich fizykochemicznych oddziaływań pomiędzy białkami FtsZ i CrgA. Jednocześnie, przy wykorzystaniu techniki in vivo – bakteryjnego systemu dwuhybrydowego unaoczono interakcje między CrgA a białkiem podziału komórkowego FtsQ a także dwoma komponentami aparatu podziałowego należącymi do klasy wysokocząsteczkowych białek wiążących penicylinę: FtsI i PbpA. Zauważono także, iż molekuły CrgA są w stanie oddziaływać pomiędzy sobą, co zostało następnie potwierdzone przy zastosowaniu kolumny filtracji żelowej. Pozwoliło to na ustalenie formy białka CrgA będącego w stanie równowagi termodynamicznej jako dimer.

Oddziaływania pomiędzy cząsteczkami charakteryzowanego w pracy białka a białkami wiążącymi penicylinę, uczestniczącymi w transpeptydacji peptydoglikanu podczas syntezy przegrody międzykomórkowej, muszą mieć wyjątkowe znaczenie fizjologiczne. Zmiany puli dostępnego w komórce CrgA okazały się bowiem znacząco modulować profil antybiotykooporności prątków. Nadprodukcja CrgA prowadziła do istotnego zwiększenia wrażliwości *M. tuberculosis* na działanie cefaleksyny, antybiotyku beta laktamowego wykazującego najwyższe powinowactwo do FtsI, oraz zmniejszała wrażliwość tego szczepu na działanie vankomycyny. Dodatkowo, zastosowane po raz pierwszy dla *Mycobacterium*, barwienie *M. smegmatis* nadprodukującego CrgA<sub>TB</sub> fluorescencyjnym analogiem penicyliny V (bocilliny) ukazało wzmożenie intensywności barwienia w porównaniu ze szczepem dzikim. Ponieważ bocillina blokuje miejsca enzymatycznie czynne białek wiążących penicylinę, świadczyło to o wzmożonym lokalizowaniu, lub aktywacji białek wiążących penicylinę. Wyniki te zostały poparte analizą lokalizacji GFP-FtsI w badanych szczepach. Podobnie jak w przypadku barwienia bocilliną, sygnał GFP-FtsI był o wiele bardziej wyraźny w obecności podwyższonych poziomów CrgA w komórce, niż w przypadku próby kontrolnej.

Podsumowując, przy zastosowaniu różnorodnych metod badawczych zcharakteryzowano CrgA jako nowe białko wchodzące w skład aparatu podziałowego komórki *Mycobacterium tuberculosis*. Pomimo tego, iż nie określono aktywności biochemicznej badanego białka, na podstawie otrzymanych wyników można sugerować bezpośrednie lub pośrednie jego zaangażowanie w proces syntezy peptydoglikanu podczas tworzenia przegrody poprzecznej komórki. Dodatkowo zdolność CrgA do oddziaływania z wieloma białkami podziału komórkowego jak FtsZ, FtsQ, FtsI i PbpA, a być może także innymi białkami wydaje się wpływać na tempo wzrostu i antybiotykooporność patogennych prątków. Dane zgromadzone w prezentowanej pracy nie tylko poszerzają ciągle ubogą wiedzę na temat podziału komórki *M. tuberculosis* ale być może pozwolą w przyszłości na opracowanie nowych skutecznych strategii w walce z tą niezwykle zjadliwą bakterią.