

AUTOREFERAT

Anna Brzostek

Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź

Łódź 2015

DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

1. **Imię i nazwisko: Anna Małgorzata Brzostek**
2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

doktor nauk biologicznych*dyscyplina: biologia**specjalność: genetyka*

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, czerwiec 1997

Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Konstrukcja gatunkowo specyficznej sondy DNA oraz transgenicznego szczepu *M. vaccae**” (promotor Prof. dr hab. Adam Jaworski; recenzenci: Prof. dr hab. Andrzej Płucienniczak, Prof. dr hab. Leon Sedlaczek).**magister biologii**

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, czerwiec 1993

Tytuł pracy magisterskiej: „*Wyznaczniki molekularne w genetycznej determinacji szczepów *Mycobacterium**” (promotor Prof. dr hab. Adam Jaworski).

INFORMACJE O ZATRUDNIENIU

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1997 - obecnie	Adiunkt/asystent w Instytucie Biologii Medycznej PAN, Łódź (dawniej Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN), Pracownia Genetyki i Fizjologii <i>Mycobacterium</i>
1993 - 1997	Słuchacz stacjonarnego Studium Doktoranckiego Cytogenetyki i Radiobiologii przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź (obecnie: Wydział Biologii i Ochrony Środowiska)

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

4. **Wskazanie osiągnięcia naukowego*** wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

*W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstawanie (załącznik Z6)

„Metabolizm steroidów w patogenezie prątków gruźlicy”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl sześciu oryginalnych publikacji naukowych, które zostały przedstawione w Tabeli 1.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Tabela 1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.

Lp.	Dane bibliograficzne	IF	Punkty MNiSW
1.	Brzostek A, Sliwinski T, Rumijowska-Galewicz A, Korycka-Machala M, Dziadek J: Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in Mycobacterium smegmatis. MICROBIOLOGY-SGM 2005; 151: 2393-2402.	3,173	30
Indywidualny wkład-70%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzór nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowanie i optymalizacja warunków technik i metod stosowanych w pracy, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami			
2.	Brzostek A, Dziadek B, Rumijowska-Galewicz A, Pawelczyk J, Dziadek J: Cholesterol oxidase is required for virulence of Mycobacterium tuberculosis. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 2007; 275 (1): 106-112.	2,274	20
Indywidualny wkład-70%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzór nad przebiegiem badań opisanych w pracy, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy z wyjątkiem preparowania organów zwierząt laboratoryjnych, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami			
3.	Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J: Mycobacterium tuberculosis Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. JOURNAL OF BACTERIOLOGY 2009; 191 (21): 6584-6591.	3,940	30

Indywidualny wkład-65%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzór nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowanie i optymalizacja warunków technik i metod stosowanych w pracy z wyjątkiem barwienia cholesterolu oraz dynamiki przenikania rifampicyny przez osłony komórkowe, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami			
4.	Brzezinska M, Szulc I, Brzostek A , Klink M, Kielbik M, Sulowska Z, Pawelczyk J, Dziadek J: The role of 3-ketosteroid 1(2)-dehydrogenase in the pathogenicity of Mycobacterium tuberculosis. BMC MICROBIOLOGY 2013 Volume: 13 Article Number: 43 DOI: 10.1186/1471-2180-13-43	2,976	30
Indywidualny wkład-20%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, konstrukcja ukierunkowanych mutantów <i>M. tuberculosis</i> , przygotowanie zdefiniowanej zawiesiny prątków o określonej żywotności (i ich barwienie) do infekcji komórek eukariotycznych, udział w przygotowaniu manuskryptu			
5.	Brzostek A , Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Wojcik EA, Dziadek J: ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 2013; 134: 1-7.	4,049	30
Indywidualny wkład-70%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, nadzór nad przebiegiem badań opisanych w pracy, opracowanie i optymalizacja warunków technik i metod stosowanych w pracy, przygotowanie materiału do doświadczeń, przygotowanie manuskryptu wraz z wszystkimi rycinami, wykonanie większości eksperymentalnej części pracy, analiza wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu wraz z rycinami			
6.	Klink M, Brzezinska M, Szulc I, Brzostek A , Kielbik M, Sulowska Z, Dziadek J: Cholesterol Oxidase Is Indispensable in the Pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: PLOS ONE 2013 ; 8 (9) Article Number: e73333 DOI: 10.1371/journal.pone.0073333	3,534	40
Indywidualny wkład-20%: udział w wypracowaniu koncepcji badawczej, konstrukcja ukierunkowanych mutantów <i>M. tuberculosis</i> , przygotowanie zdefiniowanej zawiesiny prątków o określonej żywotności (i ich barwienie FITC) do infekcji komórek eukariotycznych, udział w przygotowaniu manuskryptu			
sumaryczny IF zgodnie z rokiem publikacji oraz punkty MNiSW z 2014r.		19,946	180

OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH PRZEDŁOŻONYCH DO OCENY

WPROWADZENIE

Rodzaj *Mycobacterium* to zróżnicowana grupa drobnoustrojów powszechnie występujących w środowisku. Należą do niego zarówno szybko rosnące gatunki saprofityczne, dla których czas podziału komórki wynosi 2-4 godziny, jak i gatunki wolno rosnące, charakteryzujące się długim czasem podziału komórkowego, od 12-14 i 24 godzin aż do nawet 1-2 tygodni w przypadku, odpowiednio *M. avium*, *M. tuberculosis* complex oraz *M. leprae*. Najważniejszą grupę w obrębie rodzaju *Mycobacterium* stanowią wolno rosnące gatunki zaliczane do *M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, będące niebezpiecznymi patogenami ludzi i zwierząt. Ponadto groźnym patogenem człowieka, poza *M. tuberculosis*, jest także *M. leprae* stanowiący czynnik etiologiczny trądu. W zakażeniach ludzi największe znaczenie wśród prątków niegruźliczych mają drobnoustroje z grupy *M. avium* complex, a głównym ich przedstawicielem jest *M. avium paratuberculosis* wywołujący chorobę Johna. Wiele gatunków prątków stanowi szczególne zagrożenie dla osób z obniżoną odpornością organizmu, w tym chorych na AIDS, pacjentów poddanych terapii immunosupresyjnej, a także osób uzależnionych od alkoholu oraz po przebytej wcześniej gruźlicy lub dotkniętych przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP).

Najbardziej niebezpiecznym dla człowieka przedstawicielem rodzaju *Mycobacterium* jest, będący czynnikiem etiologicznym gruźlicy, *M. tuberculosis*. Eksperci Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) szacują, że prątki gruźlicy są przyczyną około 2 mln zgonów rocznie co czyni gruźlicę najczęstszą przyczyną śmierci spowodowanej przez zakażenie bakteryjnym patogenem. Najtrudniejsza sytuacja epidemiologiczna charakteryzuje obszary Afryki i Azji, skąd pochodzi aż 85% wszystkich zarejestrowanych przypadków gruźlicy na świecie, jednakże również w Europie Wschodniej notuje się około 250 tys. nowych przypadków zachorowań na gruźlicę rocznie. Istniejącą sytuację epidemiologiczną determinuje wiele czynników, wśród których przede wszystkim należy podkreślić pojawienie się leko- i wielolekoopornych szczepów prątków gruźlicy. W przypadku zakażeń wywołanych przez lekowrażliwe prątki *M. tuberculosis* wczesna identyfikacja czynnika etiologicznego oraz prawidłowy przebieg zastosowanej terapii antybiotykowej, wspomagającej wrodzoną i adaptacyjną odporność makroorganizmu, prowadzą do efektywnej eliminacji obrazu klinicznego gruźlicy. Natomiast, infekcje powodowane przez leko- i wielolekooporne szczepy prątków gruźlicy wymagają wprowadzenia skomplikowanej i kosztownej terapii skojarzonej, z zastosowaniem leków drugiej linii, która niestety jednocześnie jest przyczyną wielu niepożądanych efektów ubocznych.

Najczęstszym źródłem zakażenia *M. tuberculosis* jest prątkujący chory z aktywną gruźlicą, a do infekcji dochodzi drogą kropelkową poprzez inhalację nawet kilku prątków i ich dalszą interakcję z komórkami nabłonka płuc. W pierwszej fazie zakażenia prątkami gruźlicy kluczową rolę odgrywają nieswoiste komórkowe mechanizmy odporności wrodzonej, reprezentowane przez, pochłaniające mykobakterie, makrofagi alveolarne oraz lokalne

komórki dendrytyczne. U dorosłych, zdrowych osobników immunokompetentnych około 90% wnikających do makroorganizmu prątków gruźlicy jest eliminowanych przez makrofagi alweolarne na drodze fagocytozy, jednakże makrofagi o niskim poziomie aktywności mogą stać się miejscem wewnątrzkomórkowego namnażania się mykobakterii. Fenomen przeżywania prątków w słabo aktywnych makrofagach warunkowany jest przez zdolność tych wewnątrzkomórkowych patogenów bakteryjnych do blokowania fuzji fagosomów **zlizosomami**. Zjawisko to związane jest ze zdolnością prątków do hamowania wydzielania z fagosomu białka TACO (Tryptophan-Aspharate-Containing Coat Protein), które jest niezbędne do utworzenia fagolizosomu. Pochłaniające prątki gruźlicy komórki dendrytyczne, a także makrofagi alweolarne zaangażowane są w proces prezentacji antygenów prątków limfocytom T CD4⁺ i T CD8⁺, co prowadzi do aktywacji tych komórek i rozwoju swoistej adaptacyjnej odporności typu komórkowego. Dodatkowo, wytwarzana przez makrofagi alweolarne i komórki dendrytyczne IL-12 powoduje aktywację komórek NK, które wspólnie z aktywowanymi limfocytami T uwalniają IFN- α , będący cytokiną niezbędną do aktywacji i nasilenia właściwości bakteriobójczych makrofagów. Rozwojowi swoistej odporności komórkowej na antygeny prątków gruźlicy towarzyszy izolacja prątków w obrębie zmian ziarniniakowatych (granuloma), które utworzone są przez wielojądrowe makrofagi otoczone przez limfocyty T, fibroblasty, neutrofile i białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Odgraniczenie prątków od zdrowej tkanki prowadzi do ich latencji przejawiającej się jako zahamowanie ich namnażania i metabolizmu. Dane epidemiologiczne wskazują, że około 2 miliardy ludzi jest nosicielami latentnej postaci gruźlicy, a eksperci WHO oceniają, że u około 5-7% z tych osób dochodzi w ciągu życia do rozwinięcia się aktywnej postaci choroby. Będące wynikiem osłabienia odporności przypadki reaktywacji latentnej gruźlicy, do której może dochodzić po kilku a nawet kilkudziesięciu latach od zakażenia pierwotnego, wskazują na zdolności prątków do przeżywania, w stanie uśpienia, w komórkach gospodarza, bez wywoływania objawów chorobowych. Z drugiej strony dane WHO mogą sugerować, iż u osobników immunokompetentnych wrodzone i adaptacyjne mechanizmy odpornościowe kontrolują przebieg zakażenia latentnego. Zdolność do długotrwałego przeżywania prątków gruźlicy w organizmie człowieka, często pomimo stosowania właściwej terapii antybiotykowej, wynika z przystosowywania się samych bakterii do zmieniających się warunków środowiska. Zaobserwowano, że ekspresja genów prątków może być regulowana różnymi czynnikami środowiskowymi, w tym również brakiem dostępu do tlenu czy niedoborem składników odżywczych, które charakteryzują późną fazę infekcji. Jednym z kluczowych enzymów podlegających ekspresji w komórkach prątków zlokalizowanych w obrębie zmian ziarniniakowych jest reduktaza azotanowa, która jest zaangażowana w proces oddychania beztlenowego. Enzym ten jest niezbędny dla przebiegu wielu szlaków biosyntetycznych i odpowiada za przenoszenie atomu węgla z kwasów tłuszczowych na glukozę. Sugeruje się, że w warunkach beztlenowych to właśnie związki lipidowe stanowią źródło węgla dla *Mycobacterium*. W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzona została analiza globalnej ekspresji genów *Mycobacterium* w różnych niszach, makrofagach i granuloma, a także w sztucznych warunkach imitujących te mikrośrodowiska. Obserwacje dotyczące

ekspresji poszczególnych genów w badanych warunkach mogą pośrednio dokumentować ich znaczenie dla patogenezy prątków, wewnątrzkomórkowego namnażania tych drobnoustrojów lub ich przeżywania w fazie latencji. Analiza mRNA wykazała, że komórki *Mycobacterium* hodowane w niskim pH charakteryzują się nadprodukcją enzymów takich jak: liaza izocytrynianowa czy dehydrogenaza 3-hydroksy acetylokoenzymu A. Dodatkowo, niskie pH środowiska przyczynia się do zwiększonej ekspresji genów kodujących białka wielu nieznanych monooksygenaz, hydroksylaz czy dehydrogenaz, białka uczestniczące w regulacji transkrypcji, oraz do nadprodukcji białek rodziny PE. Z drugiej strony, szok kwasowy wpływa na obniżenie ekspresji genów kodujących białka metabolizmu podstawowego, białka rodziny PPE, białka membranowe, a także enzym **oksydazę cholesterolową (ChoD)**, katalizującą przekształcanie, w obecności tlenu, cholesterolu do 3-ketosteroidów. Z kolei inni autorzy, zaobserwowali w komórkach *M. marinum* izolowanych ze zmian ziarniniakowych u żab, nadprodukcję enzymu **dehydrogenazy hydroksysteroidowej (HsdD)**, pełniącego podobną funkcję jak ChoD lecz działającego bez udziału tlenu. Ponadto zauważono, że niektóre geny *M. marinum* są aktywowane wyłącznie u prątków zlokalizowanych w obrębie granuloma (np. dehydrogenaza hydroksysteroidowa), z kolei inne we wczesnych etapach infekcji – w makrofagach. Wiele genów *M. tuberculosis*, indukowanych w ludzkich makrofagach i podlegających zwiększonej ekspresji, koduje enzymy uczestniczące w metabolizmie lipidów (liaza izocytrynianowa, acetylotransferaza acetylokoenzymu A, dehydrogenaza alkoholowa, monooksygenazy). Obecność licznych genów powiązanych z metabolizmem lipidów jest cechą unikatową dla mykobakterii. W genomie *M. tuberculosis* zidentyfikowano 233 geny kodujące białka związane z biosyntezą lub katabolizmem związków lipidowych, które stanowią około 6% wszystkich zidentyfikowanych genów. Pośród nich znaczną grupę tworzą geny kodujące enzymy zaangażowane w biosyntezę lipidów, glikolipidów, lipoglikolipidów i poliketydów ściany komórkowej prątków. Dodatkowo zidentyfikowano również geny kodujące białka uczestniczące w cyklu β -oksydacji lipidów oraz ponad 100 genów kodujących enzymy alternatywnych szlaków oksydacji lipidów, co może mieć związek ze zdolnością bakterii do degradacji lipidów komórek gospodarza. Interesującym jest fakt, iż genom prątków zawiera ponadto geny dla około 20 enzymów wymagających do swej aktywności cytochromu P450 jako kofaktora. Może to świadczyć o udziale tych enzymów w procesach przekształcania związków wielkocząsteczkowych, takich jak sterole, lub ich zaangażowaniu w degradację ksenobiotyków.

Jednocześnie postuluje się, że degradacja kwasów tłuszczowych jest głównym źródłem energii dla wewnątrzkomórkowego namnażania się prątków, a bogate w lipidy, podlegające reorganizacji, osłony komórkowe stanowią mechanizm obronny tych patogennych bakterii chroniący je przed reakcjami odpornościowymi gospodarza. Kluczowym elementem składowym komórek mykobakterii, umożliwiającym przeżywanie w komórkach gospodarza, jest skomplikowana struktura ich ściany komórkowej. Obecność dużej ilości różnorodnych lipidów sprawia, że ściana komórkowa prątków stanowi nie tylko skuteczną barierę przepuszczalności dla związków chemicznych, w tym chemioterapeutyków stosowanych

w leczeniu gruźlicy, ale także pełni istotną funkcję w patogenezie tych wewnątrzkomórkowych patogenów.

OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO (z podaniem, dla każdego etapu przedstawianej pracy celu, osiągnięć i możliwych zastosowań)

Celem głównym przedstawionego do oceny cyklu publikacji była identyfikacja i charakterystyka wybranych, potencjalnie zaangażowanych w proces degradacji steroidów, enzymów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* oraz poznanie ich roli w procesie patogenezy prątków gruźlicy.

Zdolność szybkorosnących, środowiskowych szczepów *Mycobacterium* do degradacji steroidów była znana i wykorzystywana w procesach biotechnologicznych do produkcji leków i hormonów steroidowych od połowy XX wieku. Niewiele natomiast było informacji na temat genetycznego podłoża tego procesu. Początkowo przyjmowano, że szczepy wolnorosnące, w tym *M. tuberculosis*, takiej zdolności nie posiadają i mogą co najwyżej akumulować cholesterol. W 1998 roku, po zsekwencjonowaniu genomu szczepu *M. tuberculosis* H37Rv, jako jednego z pierwszych genomów bakteryjnych, stało się jasne, że prątek gruźlicy jest również wyposażony w potencjalne geny kodujące enzymy biotransformacji steroidów.

Degradacja cholesterolu jest złożonym, wieloenzymatycznym szlakiem metabolicznym rozpoczynającym się od oksydacji jego alkilowego łańcucha bocznego i struktury pierścieniowej. Kluczowymi enzymami uczestniczącymi w degradacji struktury pierścienia cholesterolu są:

- oksydaza cholesterolowa (ChoD) i dehydrogenaza hydroksysteroidowa (HsdD), katalizujące reakcję oksydacji 3 β -hydroksy-5-ene substratów do 3-keto-4-ene produktów
- Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa (KstD), katalizująca reakcję dehydrogenacji pierścienia A cyklopentanofenantrenu
- 9 α -hydroksylaza, wprowadzająca grupę hydroksylową przy węglu 9 pierścienia B.

Na szczególną uwagę zasługują ostatnie dwa enzymy, a mianowicie Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa i 9 α -hydroksylaza, które są niezbędne do rozpoczęcia procesu degradacji struktury pierścieniowej steroli. Otrzymane w ten sposób steroidy 3-keto-,1,4 –dienowe są wyjątkowo cenne w przemyśle farmaceutycznym, z uwagi na ich silne właściwości antyalergiczne i przeciwreumatyczne.

W pierwszej pracy, przedstawionej do oceny, podjęto się identyfikacji genu *kstD*, kodującego kluczową Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową *M. smegmatis*, a także konstrukcji szczepu mutanta *M. smegmatis* charakteryzującego się zmodyfikowanymi zdolnościami biotransformacji związków steroidowych. Ponadto postanowiono zweryfikować funkcjonalność genu *kstD* *M. tuberculosis* w układzie heterologicznym z wykorzystaniem ukierunkowanego mutanta *M. smegmatis*. Enzym Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa jest niezbędny do degradacji struktury pierścieniowej steroli a mutanty pozbawione jego

aktywności powinny akumulować produkty pośrednie tej degradacji takie jak AD (androstendion) i/lub 9OHAD (9 α -hydroksyandrostendion). Przeprowadzona analiza bioinformatyczna sekwencji genomów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*, zdeponowanych w bazie danych, pozwoliła na zidentyfikowanie aż 6 potencjalnych genów *kstD* w genomie szczepu szybko rosnącego oraz 2 (w tym jednego niekompletnego) u prątka gruźlicy. Analiza porównawcza poszczególnych genów *kstD* wykazała ponad 80% identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowej dla MT3641 i MSMEG5898. N-terminalny motyw białka wiążący FAD jest ważny dla aktywności enzymatycznej dehydrogenazy i został on zidentyfikowany dla dwóch białek KstD *M. smegmatis* (MSMEG5898 i MSMEG4850) oraz dla jednego białka KstD *M. tuberculosis* (MT3641). Do dalszych badań wybrano geny: *M. smegmatis kstD-1* (MSMEG5898) i *kstD-2* (MSMEG4855) odznaczające się odpowiednio 78% i 33% stopniem homologii z przypuszczalnym genem *kstD M. tuberculosis*. Analizę funkcjonalną potencjalnych genów *kstD M. tuberculosis* postanowiono przeprowadzić poprzez konstrukcję szczepu mutantu *M. smegmatis* przy zastosowaniu dwuetapowej metody wymiany alleli z wykorzystaniem homologicznej rekombinacji, która pozwala na unieczynnienie wybranego, docelowego genu bez naruszenia ekspresji pozostałych genów, oraz bez konieczności wprowadzania genów reporterowych. Wykorzystując z powodzeniem metodę homologicznej rekombinacji skonstruowano defektywne szczepy *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych, pojedynczych genów *kstD-1* i *kstD-2*, a także szczep ze zinaaktywowanymi obydwoma badanymi genami. Zdolność szczepu kontrolnego *M. smegmatis* oraz uzyskanych mutantów do degradacji cholesterolu była oceniana z wykorzystaniem chromatografii gazowej (GC), wobec odpowiednich standardów wewnętrznych. Zaobserwowano, że szczep „dziki” *M. smegmatis* wykazywał zdolność do całkowitej degradacji cholesterolu w czasie 48 godzinnej inkubacji. Natomiast inaktywacja genu *kstD-1* doprowadziła do akumulacji produktów pośrednich degradacji cholesterolu: AD lub 9OHAD. W przypadku szczepu pozbawionego genu *kstD-2* proces degradacji cholesterolu odbywał się nieomalże w tym samym czasie jak u szczepu dzikiego, a AD i 9OHAD były obserwowane jedynie w śladowych ilościach.

Zatem przeprowadzone badania jednoznacznie wykazały, iż KstD-1 jest główną dehydrogenazą ketosteroidową *M. smegmatis*.

Następnie postanowiono wykorzystać skonstruowanego mutantu *M. smegmatis* $\Delta(kstD1-kstD2)$ do weryfikacji funkcjonalności potencjalnego genu *kstD* identyfikowanego w genomie *M. tuberculosis*. Do szczepu mutantu wprowadzono wektor plazmidowy, noszący gen *kstD_{Mtb}* (MT3641) pod kontrolą silnego promotora P_{hsp} , i wykazano, że otrzymany szczep odzyskał zdolność do całkowitej degradacji cholesterolu. Dla drugiego genu *kstD M. tuberculosis* (MT0809) nie potwierdzono aktywności enzymatycznej, co prawdopodobnie ma związek z niepełną sekwencją tego białka w regionie odpowiedzialnym za wiązanie FAD.

Powyższe analizy upoważniają do stwierdzenia, że zarówno *kstD-1 M. smegmatis*, jak i MT3641 *M. tuberculosis* są zasadniczymi dehydrogenazami ketosteroidowymi uczestniczącymi w degradacji cholesterolu, zaangażowanymi w proces przekształcania AD do ADD (androstadiendion). Z kolei niska aktywność enzymatyczna pozostałych

przypuszczalnych dehydrogenaz steroidowych *M. smegmatis* może wynikać z ich odmiennej preferencji substratowej, która dotąd nie została zweryfikowana.

W kolejnych latach, dzięki zastosowaniu metod wysokoprzepustowych opartych o mikromacierze RNA czy mutagenezę transpozonową, coraz częściej wskazywano geny metabolizmu steroidowego jako potencjalne czynniki wirulencji prątków gruźlicy. Geny te znalazły się na liście niezbędnych dla przeżycia *M. tuberculosis*: w makrofagach, ulegających zwiększonej ekspresji wewnątrz komórek fagocytarnych czy też indukowanych w warunkach imitujących proces zakażenia (obniżony poziom tlenu, zakwaszenie środowiska itp.). Ponadto dane literaturowe jednoznacznie przedstawiały, że cholesterol występujący w błonie cytoplazmatycznej komórek eukariotycznych jest niezbędny dla fagocytozy *M. tuberculosis*. Oprócz tego cholesterol jest konieczny dla dojrzewania fagosomów, a zahamowanie tego procesu zapobiega fuzji fagosomów z lizosomami i chroni prątki przed wewnątrzkomórkowym zabijaniem. Wykazano także, że prątki indukują różnicowanie się makrofagów do makrofagów piankowych (z ang. foamy macrophages), wypełnionych ciążkami lipidowymi, umożliwiając im wieloletnie przeżywanie w stanie uśpienia (faza latencji). Dane literaturowe dowodzą, że inaktywacja genu *mce4* kodującego transporter typu ABC, zaangażowany w transport cholesterolu, hamuje zdolność prątków gruźlicy do wzrostu w warunkach *in vitro*, na podłożu z cholesterolu jako jedynym źródłem węgla i energii, oraz powoduje ich atenuację podczas zakażenia.

Powyzsze obserwacje opisane przez autorów prac sklonily nas do postawienia pytania czy prątki gruźlicy mają zdolność do akumulacji i/lub degradacji cholesterolu.

Odpowiedź na to pytanie zawarto w przedstawionej do oceny pracy nr 3, gdzie po raz pierwszy wykazano, że prątki gruźlicy są zdolne do degradacji cholesterolu na drodze, w której produktami pośrednimi są AD/9OHAD, a dehydrogenaza ketosteroidowa jest enzymem niezbędnym w tym procesie.

Akumulację cholesterolu w komórkach prątków gruźlicy badano z wykorzystaniem radioaktywnie znakowanego cholesterolu. Zaobserwowano, że cholesterol ulega akumulacji we frakcji ściany komórkowej a nie w cytozolu bakterii. Uzyskane wyniki zostały następnie potwierdzone i zobrazowane po opracowaniu metody barwienia cholesterolu magazynowanego w komórkach bakterii, specyficznym barwnikiem - filipin. Ponadto otrzymane wyniki zostały zweryfikowane metodami chromatograficznymi (chromatografia cienkowarstwowa i gazowa) co pozwoliło dodatkowo dowieść, że cholesterol jest akumulowany we frakcji wolnych lipidów ściany komórkowej, razem z fosfolipidami, glikolipidami i sfingolipidami. Próbując zrozumieć fizjologiczne znaczenie akumulacji cholesterolu wykazano, że prowadzi ona do zmiany przepuszczalności osłon komórkowych prątków, upośledzając wnikanie do komórek jednego z najważniejszych leków przeciwprątkowych, rifampicyny. Jednocześnie akumulacja cholesterolu nie oznaczała braku zdolności prątków gruźlicy do degradacji tego sterolu. **W celu potwierdzenia zdolności *M. tuberculosis* do degradacji cholesterolu postanowiono skonstruować szczep pozbawiony funkcjonalnego genu Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej ($\Delta kstD$) i akumulujący pośrednie produkty degradacji takie jak: AD i/lub 9OHAD.** Ukierunkowanego

mutanta *M. tuberculosis* $\Delta kstD$ uzyskano wykorzystując proces homologicznej rekombinacji. Przeprowadzone analizy kinetyki wzrostu szczepu mutanta *Mtb* $\Delta kstD$ i szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* na podłożu mineralnym z dodatkiem cholesterolu jako jedyne źródła węgla, wykazały osłabiony wzrost szczepu mutanta w porównaniu do szczepu dzikiego. Poddane analizom chromatografii gazowej próby hodowli, ujawniły zwiększającą się w czasie (nawet po dwóch tygodniach hodowli) akumulację produktów pośrednich degradacji cholesterolu, zwłaszcza 9OHAD, w przypadku szczepu *Mtb* $\Delta kstD$ wraz z jednoczesnym ubytkiem substratu.

W oparciu o powyższe eksperymenty jednoznacznie wykazano, że *M. tuberculosis* posiada zdolność do degradacji cholesterolu, enzymem niezbędnym w tym procesie jest Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa, a produktami pośrednimi są AD i 9OHAD.

Konstrukcja szczepu mutanta *Mtb* $\Delta kstD$ niezdolnego do całkowitej degradacji cholesterolu pozwoliła również na postawienie pytania o znaczenie procesu degradacji cholesterolu dla zdolności wnikania prątków do makrofagów oraz wewnątrzkomórkowego przeżywania tych drobnoustrojów. Odpowiedź na to pytanie uzyskano w badaniach doświadczalnych, przedstawionych w pracy nr 4, przeprowadzonych z zastosowaniem modelu ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej THP-1. Różnicowanie się monocytów THP-1 do stadium makrofagów wykonano w warunkach *in vitro*, w obecności octanu mirystynianu forbolu (PMA), a skuteczność zastosowanej procedury doświadczalnej oceniono na podstawie analizy ekspresji powierzchniowych cząsteczek CD14, z wykorzystaniem techniki fluorocytometrii przepływowej (FACS). Następnie, makrofagi spoczynkowe i aktywowane INF- γ zakażano *in vitro* szczepem dzikim *M. tuberculosis*, mutantem $\Delta kstD$ oraz szczepem komplementacyjnym $\Delta kstD$ -*kstD* zarówno opsonizowanym jak i nieopsonizowanym ludzką surowicą. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie liczby makrofagów zaangażowanych w proces pochłaniania prątków. Liczbę zakażonych fagocytów i pochłoniętych przez nie bakterii oznaczano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Kolejnym zadaniem badawczym było porównanie przeżywalności badanych szczepów prątków w makrofagach, w oparciu o liczbę jednostek koloniotwórczych (CFU). W 6. dniu po infekcji makrofagów zaobserwowano, że szczep pozbawiony aktywności KstD charakteryzował się upośledzoną zdolnością do wewnątrzkomórkowego namnażania zarówno w komórkach fagocytów spoczynkowych, jak i aktywowanych INF- γ , w porównaniu do poziomu wewnątrzkomórkowego wzrostu zanotowanego dla szczepu dzikiego i komplementacyjnego, co wskazuje na jego atenuację. **Postawiono zatem hipotezę, że degradacja cholesterolu jest ważnym czynnikiem umożliwiającym replikację prątków wewnątrz makrofagów lub też, że brak funkcjonalnej kopii genu *kstD* może modyfikować metabolizm podstawowy bakterii wpływając tym samym na właściwości patogenne prątków.** W toku prowadzonych badań stwierdzono również, że zablokowanie, przez inhibitor kinazy IRAK1/4 lub monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko TLR2, szlaku przekazywania sygnałów z receptora TLR2 makrofagów, przed ich *in vitro* zakażeniem badanymi szczepami mykobakterii, przyczyniło się do nasilenia wewnątrzkomórkowego wzrostu szczepu mutanta do poziomu ocenionego dla szczepu kontrolnego. **Uzyskane wyniki**

wskazują zatem, że mutacja w genie *kstD* nie prowadzi do zaburzeń przekazywania sygnałów zależnych od pośrednictwa receptorów TLR2 w zakażonych makrofagach. Pobudzenie receptorów TLR prowadzi do uruchomienia kaskady szlaków sygnałowych w komórce gospodarza, w tym szlaku sygnałowego kinaz MAP (ang. mitogen-activated protein kinases), inicjowanego przez IRAK-1/4, który prowadzi do stymulacji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (ang. nuclear factor kappa B). W wyniku tej aktywacji pobudzane są funkcje efektorowe makrofagów manifestujące się w postaci intensyfikacji aktywności bakteriobójczej i prozapalnej tych komórek, jak również stymulacji wydzielania chemokin i cytokin prozapalnych, a także syntezy reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA). W kolejnym etapie pracy sprawdzono właściwości bakteriobójcze makrofagów, w oparciu o stężenie wytwarzanych RFT i RFA, w odniesieniu zarówno do infekcji szczepem dzikim *M. tuberculosis*, jak i mutantem Δ *kstD*. Dodatkowo, dla każdego z układów doświadczalnych, oceniono także produkcję prozapalnej cytokiny α -TNF oraz regulatorowej IL-10. **Podsumowując przedstawione w tej pracy wyniki można stwierdzić, że istnieje związek pomiędzy metabolizmem cholesterolu prątków gruźlicy, a ich zdolnością do przeżywania w makrofagach, a także funkcjonalną odpowiedzią makrofagów na zakażenie *M. tuberculosis*.**

Kolejne zadania badawcze realizowane w ramach przedstawianego cyklu publikacji zmierzały do określenia funkcji oksydazy cholesterolowej w degradacji cholesterolu oraz patogenezie *M. tuberculosis* (prace nr: 2, 5, 6).

Oksydaza cholesterolowa (ChoD) jest dobrze scharakteryzowanym enzymem na poziomie genetycznym i biochemicznym. Została ona zidentyfikowana u wielu gatunków bakterii z rodzajów: *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* i *Streptomyces*. Postuluje się, że niepatogenne bakterie wykorzystują oksydazę cholesterolową do przeprowadzania procesu degradacji cholesterolu, podczas gdy patogenne angażują ją do infekowania komórek gospodarza. Metabolizm cholesterolu jest skomplikowanym procesem, w którym bierze udział wiele enzymów. Proces degradacji cholesterolu, zarówno u prątków szybko- jak i wolnorosnących, rozpoczyna się od oksydacji i izomeryzacji jego 17-alkilowego łańcucha bocznego i struktury pierścieniowej, co prowadzi do uzyskania 3-keto-4-ene pochodnych (cholestenon). Znane są dwa enzymy zdolne do przeprowadzania tej reakcji: oksydaza cholesterolowa (ChoD) i dehydrogenaza 3 β -hydroksysteroidowa (HsdD). Przypuszcza się, że pierwszy etap degradacji cholesterolu jest inicjowany przez HsdD, natomiast ChoD może być ważnym czynnikiem warunkującym proces patogenezy u *M. tuberculosis*.

Przesłanką upoważniająca do zaliczenia ChoD jako czynnika wirulencji bakterii była praca, w której autorzy wskazują na udział oksydazy cholesterolowej (ChoE) *Rhodococcus equi* jako czynnika uszkadzającego membrany komórek makrofagów. *R. equi* jest patogenem koni, ale także i ludzi z osłabionym systemem odpornościowym, wywołującym zakażenia podobne do gruźlicy. Białko ChoE wykazuje wysoki stopień homologii na poziomie aminokwasowym z białkami oksydazy cholesterolowej izolowanymi z *Brevibacterium sterolicum*, *Streptomyces*

spp., *M. tuberculosis* i *M. leprae*. Inaktywacja *choE* prowadzi do zniesienia hemolitycznych właściwości szczepu powodujących destrukcję makrofagów i leukocytów.

Przeprowadzana analiza sekwencji nukleotydowej wielu gatunków bakterii pozwoliła na identyfikację ortologów *choD* u *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* i *M. smegmatis*. Porównane sekwencji na poziomie aminokwasowym ujawniło bardzo wysoki stopień homologii pomiędzy ChoD *M. tuberculosis* a jej ortologami z innych mykobakterii (100% z *M. bovis*, 88% z *M. leprae*, 83% z *M. smegmatis*) i jedynie 20% stopień podobieństwa z ChoE *R. equi*.

W przedstawionej pracy nr 2 dowiedziono, że funkcjonalny gen *choD* jest niezbędny dla namnażania się prątków gruźlicy w makrofagach wysiękowych, płucach i śledzionach zainfekowanych myszy. W pierwszym etapie analizowano funkcjonalność mykobakteryjnej oksydazy cholesterolowej poprzez nadprodukcję genu *choD* *M. tuberculosis* w komórkach *M. smegmatis* i obserwację czasowej akumulacji produktu aktywności ChoD, cholestenonu, z zastosowaniem metody chromatografii gazowej. Dodatkowo aktywność ChoD potwierdzono metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem ekstraktów komórek *E. coli* noszących gen *choD* *M. tuberculosis*.

W celu zbadania znaczenia ChoD w zjadliwości prątków gruźlicy skonstruowano szczep *M. tuberculosis* z niefunkcyjnym genem *choD* (*Mtb ΔchoD*) oraz szczep komplementowany genem funkcjonalnym (*Mtb ΔchoD-choD*).

Uzyskane mutanty, wraz ze szczepem kontrolnym *M. tuberculosis*, zostały użyte do infekcji *in vitro* mysich makrofagów wysiękowych. Po 6 i 8 dniach od zakażenia zaobserwowano znaczący spadek liczby bakterii w przypadku szczepu *Mtb ΔchoD*, w porównaniu do liczby komórek prątków zanotowanych dla szczepu kontrolnego i komplementacyjnego. Następnie te same szczepy mykobakterii wykorzystano do infekcji myszy szczepu C57BL/6. Po 10 tygodniach od podania bakterii, myszy poddawano eutanazji, a następnie izolowano śledziony i płuca, których homogenaty posiewano na podłoża hodowlane w celu sprawdzenia liczby prątków mierzonej na podstawie kolonii bakteryjnych (CFU) wyrosłych na podłożu 7H10/OADC. Zaobserwowano, iż infekcja myszy szczepem *ΔchoD*, prowadzi do prawie całkowitej eliminacji bakterii w płucach zwierząt laboratoryjnych, natomiast w śledzionach liczba komórek prątków badanego szczepu mutanta, była istotnie ograniczona w stosunku do liczby bakterii określonej dla szczepów noszących funkcjonalną kopię genu *choD*.

Przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo* jednoznacznie wskazywały na udział ChoD w procesie patogenezy prątków.

Kontynuacją tych badań była realizacja pracy nr 6 zmierzająca do oceny bakteriobójczej i prozapalnej odpowiedzi makrofagów na zakażenie szczepem „dzikim” *M. tuberculosis* oraz mutantem pozbawionym funkcjonalnego genu *choD*. Z wykorzystaniem ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej THP-1, zbadano udział receptora TLR2 i wiążącego składową dopełniacza, receptora CR3 w aktywacji przeciwaprątkowych mechanizmów ludzkich makrofagów.

Zaobserwowano ograniczoną zdolność do wewnątrzkomórkowego namnażania się *in vitro* szczepu *Mtb ΔchoD* w wykorzystanych w doświadczeniach makrofagach, w porównaniu do wzrostu szczepów zawierających funkcjonalny gen *choD*.

Dodatkowo, przeprowadzone blokowanie receptorów TLR2 i CR3 makrofagów przyczyniło się do nasilenia wewnątrzkomórkowego wzrostu szczepu *ΔchoD* w tych komórkach. Wykazano również, że szczep „dziki” *M. tuberculosis* lecz nie mutant *Mtb ΔchoD*, posiada zdolność do hamowania produkcji tlenku azotu (NO) oraz anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) na drodze zależnej od TLR2, **co może sugerować, że oksydaza cholesterolowa uczestniczy w modulacji aktywności przeciwprątkowej makrofagów.**

Powyższe prace wskazują na bezpośredni udział oksydazy cholesterolowej w procesie patogenezy prątków gruźlicy. Z drugiej strony oksydaza cholesterolowa jest u wielu drobnoustrojów kluczowym enzymem zaangażowanym w początkowych etapach szlaku degradacji cholesterolu. W ramach **kolejnego etapu badań postanowiono sprawdzić czy udział ChoD w wirulencji prątków gruźlicy jest związany z rolą tego enzymu w degradacji cholesterolu (praca nr 5).**

U bakterii opisano dwa enzymy katalizujące reakcję przekształcania cholesterolu do cholest-4-en-3-onu (cholestenon): dehydrogenaza β -hydroksysteroidowa (HsdD) i oksydaza cholesterolowa (ChoD), przy czym dominującą rolę w tym procesie przypisuje się HsdD.

Aktywność enzymatyczna ChoD z *M. tuberculosis* nigdy nie została udowodniona *in vitro*, a porównanie homologii na poziomie aminokwasowym z innymi bakteryjnymi oksydazami cholesterolowymi wykazało jej niskie pokrewieństwo, za wyjątkiem oksydazy z *Nocardia farcinica* (NFA26130)-70% i *Streptomyces coelicolor* (SCO4781)-60%.

Pomimo, iż udział ChoD *M. tuberculosis* w patogenezie prątków wydaje się być jednoznaczny, to mutacje w genie *choD* zarówno *M. tuberculosis* jak i *M. smegmatis* nie wpływają na osłabienie wzrostu mutantów na podłożu mineralnym z cholesterolem jako jedynym źródłem węgla i energii. Ponadto obserwowany brak atenuacji mutantu *Mtb ΔhsdD* na modelu gruźlicy świnki morskiej skłonił autorów do wniosku, że zdolność prątków do degradacji cholesterolu nie jest niezbędna w patogenezie *M. tuberculosis*.

Te istotne kontrowersje w literaturze naukowej zostały wyjaśnione w **pracy nr 5**. W tym celu z wykorzystaniem homologicznej rekombinacji przygotowano szereg mutantów pojedynczych i wielokrotnych *M. tuberculosis* H37Rv i *M. smegmatis* mc², pozbawionych funkcjonalnych genów *choD*, *hsdD*, *kstD* lub kilku jednocześnie. Szczep dziki *M. smegmatis* oraz jego mutanty *ΔchoD*, *ΔhsdD* i *Δ(choD,hsdD)* hodowane na podłożu bogatym i mineralnym z dodatkiem cholesterolu charakteryzowały się zdolnością do szybkiego metabolizowania cholesterolu. Ubytek cholesterolu monitorowano za pomocą chromatografii gazowej (GC). **Zdolność szczepu *M. smegmatis* *Δ(choD,hsdD)* do wzrostu na podłożu mineralnym z cholesterolem, jako jedynym źródłem węgla, świadczy o tym, że ani ChoD ani HsdD nie są enzymami niezbędnymi do degradacji cholesterolu przez prątki *M. smegmatis*.** W kolejnym etapie pracy postanowiono zweryfikować hipotezę zakładającą, że HsdD nie jest niezbędna w procesie degradacji cholesterolu u prątków gruźlicy. W tym celu mutanty *M. tuberculosis* pozbawione odpowiednio funkcjonalnych genów: *choD*, *hsdD*

lub obu jednocześnie, jak również szczep kontrolny hodowano na podłożu mineralnym z dodatkiem cholesterolu i analizowano ubytek substratu z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Wszystkie szczepy mutanty były zdolne do wzrostu na podłożu z cholesterolu i jego całkowitej degradacji bez akumulacji produktów pośrednich podobnie jak szczep dziki. Ponadto przygotowano mutantą *M. tuberculosis*, który poza delecją w genach *choD*, *hsdD*, był dodatkowo pozbawiony funkcjonalnego genu *kstD*. Szczep *M. tuberculosis* $\Delta(\text{choD,hsdD,kstD})$ charakteryzował się narastającą w czasie akumulacją produktów pośrednich degradacji cholesterolu - AD/9OHAD, monitorowaną za pomocą GC, których nie identyfikowano w przypadku szczepu dzikiego, mutantą $\Delta(\text{choD,hsdD})$, ani szczepu komplementacyjnego noszącego funkcjonalny gen *kstD* [*Mtb* $\Delta(\text{choD, hsdD, kstD})$ -*kstD*]. **Przeprowadzone eksperymenty jednoznacznie wykazały, że inaktywacja genów *choD* i *hsdD* nie hamuje procesu degradacji cholesterolu przez prątki gruźlicy.** Wyciągnięto zatem wnioski, że opisany w literaturze (jak także obserwowany w naszych badaniach) brak atenuacji mutantą *Mtb* ΔhsdD podczas infekcji zwierząt laboratoryjnych nie jest jednoznaczny z tezą, że degradacja cholesterolu nie jest konieczna dla wirulencji *M. tuberculosis*, gdyż mutanty te wciąż posiadają zdolność do wykorzystania cholesterolu jako źródła węgla i energii.

Za najważniejsze osiągnięcia w przedstawionym cyklu publikacji uważam:

- ✓ wykazanie, że prątki gruźlicy są zdolne do degradacji cholesterolu, a produktami pośrednimi tego procesu są AD/ADD
- ✓ ujawnienie, że ani oksydaza cholesterolowa (ChoD), ani dehydrogenaza hydroksysteroidowa (HsdD) nie są enzymami niezbędnymi dla zapoczątkowania procesu degradacji cholesterolu przez *M. tuberculosis*
- ✓ udowodnienie, że Δ^1 -dehydrogenaza 3-ketosteroidowa (KstD) jest enzymem niezbędnym w procesie degradacji cholesterolu przez *M. tuberculosis*, a także w wewnątrzkomórkowym namnażaniu się prątków w makrofagach
- ✓ wykazanie, że oksydaza cholesterolowa (ChoD) *M. tuberculosis* jest ważnym czynnikiem wirulencji prątków gruźlicy i uczestniczy w modulowaniu odpowiedzi odpornościowej gospodarza podczas zakażenia prątkami gruźlicy.

Biorąc pod uwagę fakt, że gruźlica pomimo intensywnie prowadzonych badań, jest w dalszym ciągu jedną z najgroźniejszych chorób bakteryjnych, to poznanie mechanizmów związanych z wirulencją prątków umożliwiłoby zastosowanie odpowiedniej terapii pozwalającej na łatwiejszą eliminację choroby. Zaprezentowane prace pozwoliły zebrać informacje na temat wykorzystywania cholesterolu przez *M. tuberculosis* i zaangażowania wybranych enzymów biotransformacji związków steroidowych w proces patogenezy, które w przyszłości mogą stać się miejscami docelowymi dla nowych leków przeciwgruźliczych.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

1. Badania epidemiologiczne prątków gruźlicy.

Zdefiniowanie źródła zakażenia oraz prześledzenie dróg transmisji zakażenia w badanym środowisku społecznym stanowią ważne cele w epidemiologii gruźlicy [Jagielski i wsp. 2014]. Z tego względu, poszukiwane są metody umożliwiające identyfikację czynnika zakaźnego na poziomie gatunku, a także szczepu. Różnicowanie prątków na poziomie szczepów stało się możliwe wraz z rozwojem technik biologii molekularnej wykorzystującej markery molekularne do wykrywania polimorfizmu genomowego DNA w obrębie gatunku [Boruń-Popławska i wsp., 2005]. Typowanie genetyczne umożliwia otrzymanie indywidualnych wzorów molekularnych dla badanych szczepów, pozwalających określić pokrewieństwo między nimi. Potencjał różnicujący poszczególnych metod genetycznych zależy od rodzaju i poziomu polimorfizmu, który wykrywają. W genomie mykobakterii zaobserwowano dużą pulę sekwencji powtórzonych, wśród których dominują dwa typy powtórzeń: powtórzenia tandemowe (tandem repeats-TR) oraz powtórzenia rozproszone (interspersed repeats-IR). Do charakterystycznych sekwencji powtórzonych należą sekwencje insercyjne (insertion sequence-IS), które są zdolne do przemieszczania się w obrębie genomu. Najlepiej poznaną sekwencją insercyjną występującą w genomie *M. tuberculosis* jest sekwencja IS6110. Sekwencja IS6110 występuje w różnej liczbie kopii (0-25) i ma różną lokalizację w genomie prątków [Brzostek, Dziadek; 2012]. Sekwencja ta została wykorzystana jako specyficzny marker molekularny w typowaniu genetycznym szczepów *M. tuberculosis* w oparciu o technikę hybrydyzacji Southern blot. Metoda ta jest uznawana za „złoty standard” w dochodzeniach epidemiologicznych gruźlicy i pozwala na głębokie różnicowanie genetyczne prątków gruźlicy [Sajduda i wsp. 2004]. W genomie mykobakterii zidentyfikowano także krótkie sekwencje repetytywne (direct repeats-DR), które są wykorzystywane do badania polimorfizmu prątków z małą liczbą kopii sekwencji IS6110. Jedną z najbardziej popularnych metod genotypowania prątków, opierającą się o DR, jest technika spoligotyping. Coraz częściej w dochodzeniach epidemiologicznych prątków stosuje się metody polegające na analizie zmiennej liczby tandemowych powtórzeń (variable number of tandem repeats-VNTR), takie jak MIRU-VNTR. Metodę tę charakteryzuje wysoka czułość i powtarzalność wyników, a także duży stopień różnicowania analizowanych szczepów [Krawczyk i wsp. 2011; Zaczek i wsp., 2013b]. W ostatnich latach nastąpił rozwój nowych metod epidemiologicznych dla *M. tuberculosis* bazujących na reakcji amplifikacji DNA, ligacji fragmentów restrykcyjnych DNA i wykazujących polimorfizm sekwencji IS6110. Do nich należy metoda FLIP (fast ligation-mediated PCR) oraz nowo opisana w naszym zespole metoda FLAP (fast ligation amplification polymorphism), których siła różnicująca dla analizowanych szczepów *M. tuberculosis* jest bliska metodzie standardowej IS6110-RFLP [Zaczek i wsp., 2013a; Zaczek i wsp., 2014]. Ponadto, metody ligacyjne są tanie, szybkie i łatwe w wykonaniu, dlatego też mogą stanowić wartościowe narzędzia analiz epidemiologicznych ograniczonych kolekcji szczepów klinicznych *M. tuberculosis*.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Sajduda A, **Brzostek A**, Popławska M, Rastogi N, Sola C, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J, Portaels F: Molecular epidemiology of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Poland: a 1-year study. INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE **2004**; 12: 1448-1457
2. Boruń-Popławska M, Sajduda A, **Brzostek A**, Dziadek J, Mycobacterium tuberculosis- the 10 years of epidemiological and diagnostics studies. Acta Univ.Lodz., Folia Biol. Oecol. **2005**; 2:17-34
3. Krawczyk M, **Brzostek A**, Gorna A, Knapska K; Ziolkiewicz M, Wojtasik A, Dziadek J: Epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Lodz, Poland. INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE **2011**; 15 (9): 1252-1258
4. **Brzostek A**, Dziadek J: [Molecular genotyping methods in epidemiological investigations of TB infections]. PNEUMONOL ALERGOL POL. **2012**; 80(3):193-7
5. Zaczek A, **Brzostek A**, Gorna A, Sajduda A, Wojtasik A, Dziadek J: Application of FLiP Method for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Comparison to Commonly Used Methods, Spoligotyping and MIRU-VNTR Typing. POLISH JOURNAL OF MICROBIOLOGY **2013a**; 62 (1):73-76
6. Zaczek A, **Brzostek A**, Wojtasik A, Dziadek J, Sajduda A: Genotyping of Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates Based on IS6110 and MIRU-VNTR Polymorphisms. BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL **2013b**; Article Number: 865197 DOI: 10.1155/2013/865197
7. Zaczek A, **Brzostek A**, Kuron A, Wojtasik A, Sajduda A, Dziadek J: Development of a new ligation-mediated PCR method for the differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains. INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE **2014**; 18 (3): 302-309
8. Jagielski T, **Brzostek A**, van Belkum A, Dziadek J, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z: A close-up on the epidemiology and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. EUR J CLIN MICROBIOL INFECT DIS. **2014**; Jul 20. [Epub ahead of print]

2. Molekularne mechanizmy nabywania oporności na leki przeciwprątkowe.

Główną przyczyną niepowodzeń w walce z gruźlicą jest niewłaściwie prowadzona terapia przeciwprątkowa oraz zła realizacja znanych i sprawdzonych metod zwalczania choroby co prowadzi do pojawienia się gruźlicy lekoopornej. Badania przeprowadzone pod nadzorem WHO wskazują na ciągle wzrastającą liczbę ludzi zakażonych gruźlicą lekooporną; wielolekooporną (MDR- multidrug resistant, oporność na izoniazyd, INH i rifampicynę, RMP); gruźlicą o rozszerzonej oporności (XDR- extensively drug resistant, oporna na izoniazyd i rifampicynę oraz fluorochinolony i co najmniej jeden z leków iniekcyjnych) oraz całkowicie oporną (TDR- totally drug resistant) [Kościńska i wsp., 2011]. Monitorowanie lekooporności

prątków jest jednym z najważniejszych elementów dobrze prowadzonych programów walki z gruźlicą. Dane WHO wskazują, że w krajach bliskiego Wschodu, jak również u najbliższych naszych sąsiadów (Litwa, Łotwa, Estonia, Ukraina, Rosja) częstość występowania gruźlicy lekoopornej jest najwyższa.

Pierwszym lekiem stosowanym w terapii przeciwprątkowej od 1944 roku jest streptomycyna. Jest to antybiotyk aminoglikozydowy hamujący proces biosyntezy białek w komórkach prokariotycznych. Mechanizm nabywania lekooporności na streptomycynę przez szczepy *M. tuberculosis* ma związek z mutacjami w genach *rrs* i *rpsL* kodujących podjednostkę 16S rRNA i białko S12, stanowiących miejsca docelowe dla tego antybiotyku. Mutacje te prowadzą do zmiany konformacji małej podjednostki rybosomów uniemożliwiając przyłączenie się cząsteczki leku do miejsca docelowego. Analiza sekwencji nukleotydowej genów *rrs* i *rpsL* szczepów *M. tuberculosis* opornych na streptomycynę wykazała, że mutacje w genie *rrs* związane są z obszarem pętli 530 (obszar 501-526) lub regionu 912-915, z którym łączy się cząsteczka streptomycyny. Natomiast mutacje w genie *rpsL* kodującym białko S12 dotyczą pozycji 43 (zamiana Lys na Arg lub Thr) lub pozycji 88 (zamiana Lys na Arg) [Brzostek i wsp., 2004].

W leczeniu gruźlicy wykorzystuje się terapię wielolekową, a stosowanie pojedynczego tuberkulostatyku szybko prowadzi do selekcji szczepów opornych. Podstawowym lekiem pierwszej linii jest rifampicyna. Lek ten wiąże się z bakteryjną polimerazą RNA hamując proces transkrypcji. Oporność na rifampicynę ma związek z występowaniem mutacji w genie *rpoB* kodującym podjednostkę β -polimerazy RNA. Mutacje związane z opornością na rifampicynę dotyczą 81 nukleotydowego regionu, który może być stosunkowo łatwo amplifikowany i sekwencjonowany. Najczęściej odnotowywaną mutacją w genie *rpoB* jest substytucja pojedynczego aminokwasu w pozycji 531 (dotyczy prawie 50% rifampicyno-opornych szczepów). Pozostałe mutacje mogą dotyczyć aminokwasów w pozycji 511, 513, 516, 518, 522, 526 oraz 533 [Zaczek i wsp., 2009].

Drugim skutecznym lekiem stosowanym już od 1952 roku w leczeniu gruźlicy jest izoniazyd (hydrazyd kwasu izonikotynowego). Oporność szczepów na ten lek związana jest najczęściej z mutacjami w genie *katG* (katalazy/peroksydazy). Produkt białkowy *katG* uczestniczy w modyfikacji cząsteczki izoniazylu do jego aktywnej formy w komórkach bakterii. Najczęściej występującą mutacją w genie *katG* jest substytucja Ser do Thr w pozycji 315. U około 10% szczepów opornych na izoniazyd mutacja dotyczy obszaru promotorowego genu *inhA*, którego produkt uczestniczy w biosyntezie kwasów tłuszczowych. Ocenia się, że 90% szczepów klinicznych *M. tuberculosis* opornych na izoniazyd posiada mutacje w kodonie 315 genu *katG* lub w regionie regulatorowym genu *inhA* [Sajduda i wsp., 2004].

W celu określenia mutacji związanych z opornością na streptomycynę, rifampicynę i izoniazyd oraz identyfikacji molekularnych podstaw oporności *M. tuberculosis* na te leki, zastosowano dwie metody molekularne: analizę sekwencji nukleotydowej DNA oraz technikę PCR w czasie rzeczywistym. Ponadto przeprowadzone badania epidemiologiczne z zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej wykazały aktywną transmisję

szczepów lekoopornych i MDR w populacji polskiej [Sajduda i wsp., 2004; Jagielski i wsp., 2014].

W literaturze naukowej zostało przyjęte, że identyfikacja mutacji w obszarze genu kodującego tarczę dla leku jednoznacznie świadczy o molekularnym podłożu lekooporności u danego szczepu. To stwierdzenie jest prawdopodobnie właściwe dla najczęściej występujących mutacji. W przypadku mutacji rzadko występujących lub nowo identyfikowanych trudno jest mówić o poziomie oporności na dany lek w zależności od obecności konkretnej mutacji w genomie. Z tego względu zasadna jest weryfikacja zależności pomiędzy obecnością określonej mutacji a opornością szczepu na dany lek. W celu sprawdzenia takich zależności przygotowano odpowiednio skonstruowane wektory plazmidowe umożliwiające dokonanie oceny powiązań pomiędzy określoną mutacją a poziomem oporności na rifampicynę [Zaczek i wsp., 2009].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. **Brzostek A**, Sajduda A, Sliwinski T, Augustynowicz-Kopec E, Jaworski A, Zwolska Z, Dziadek J: Molecular characterisation of streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE* **2004**; 8 (8): 1032-1035
2. Sajduda A, **Brzostek A**, Poplawska M, Rastogi N, Sola C, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek J, Portaels F: Molecular epidemiology of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Poland: a 1-year study. *INTERNATIONAL JOURNAL OF TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE* **2004**; 8 (12): 1448-1457
3. Zaczek A, **Brzostek A**, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Dziadek, J: Genetic evaluation of relationship between mutations in *rpoB* and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. *BMC MICROBIOLOGY* **2009**; 9 Article Number: 10 DOI: 10.1186/1471-2180-9-10
4. Kozińska M, **Brzostek A**, Krawiecka D, Rybczyńska M, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopec E: [MDR, pre-XDR and XDR drug-resistant tuberculosis in Poland in 2000-2009]. *PNEUMONOL ALERGOL POL* **2011**; 79(4):278-87
5. Jagielski T, **Brzostek A**, van Belkum A, Dziadek J, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z: A close-up on the epidemiology and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland. *EUR J CLIN MICROBIOL INFECT DIS.* **2015**; Jan;34(1):41-53. doi: 10.1007/s10096-014-2202-z. Epub 2014 Jul 20

3. Mykobakteryjne systemy naprawy uszkodzeń DNA.

Prątki *M. tuberculosis* w środowisku zewnętrznym oraz podczas zakażenia narażone są na działanie szeregu czynników mogących prowadzić do uszkodzeń DNA. Wśród czynników toksycznych mogących spowodować uszkodzenia DNA prątków wymienić należy promieniowanie jonizujące, promieniowanie ultrafioletowe, wysuszenie, leki

przeciwgruźlicze, niskie pH, RFT i RFA. Genom mykobakterii charakteryzuje się wysoką stabilnością, ale jednocześnie nie zidentyfikowano w genomie prątków jednego z podstawowych systemów naprawy DNA, systemu naprawy błędnie sparowanych zasad - „mismatch repair” [Minias i wsp. 2015].

W warunkach fizjologicznych, zarówno u organizmów pro- jak i eukariotycznych dochodzi do przerywania ciągłości nici DNA i ich łączenia. Podwójne pęknięcia nici DNA (double strand breaks- DSBs) mogą pojawiać się podczas zaburzeń procesu replikacji czy wskutek działania różnych czynników egzogennych. Uszkodzenia podwójnej nici DNA pozostawione bez naprawy prowadzą do nagromadzenia się mutacji, a w konsekwencji do śmierci komórki. Do naprawy podwójnych pęknięć w DNA, komórki wykorzystują mechanizm homologicznej rekombinacji (homologous recombination- HR) oraz łączenia niehomologicznych końców DNA (non-homologous end joining – NHEJ). W komórkach ssaków uszkodzenia DSBs naprawiane są głównie przez system NHEJ, natomiast *Saccharomyces cerevisiae* wykorzystuje w tym celu homologiczną rekombinację. U *M. tuberculosis* zidentyfikowano system NHEJ, w skład którego wchodzi białko Ku i ATP zależna ligaza D (LigD) wystarczające do przeprowadzania procesu łączenia dwóch wolnych końców DNA.

Celem prowadzonych badań było wykazanie, *in vivo* i *in vitro*, roli systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA, NHEJ i HR, w komórkach *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Realizując powyższy cel skonstruowano szereg mutantów *Mycobacterium* pozbawionych funkcjonalnych genów *ku* i *ligD*, kodujących białka systemu NHEJ oraz genu *recA* kodującego podstawowe białko systemu rekombinacji homologicznej (RecA). Następnie szczepy mutanty poddawano działaniu czynników powodujących uszkodzenia DNA i analizowano ich przeżywalność będącą miarą zdolności naprawy uszkodzeń DNA. Zaobserwowano ochronne działanie systemu NHEJ w odpowiedzi na promieniowanie jonizujące i wysuszenie w stacjonarnej fazie hodowli *M. smegmatis*. Dowiedziono także niezbędności systemu NHEJ w łączeniu niekompatybilnych końców DNA [Korycka-Machała i wsp., 2006; Pitcher i wsp., 2007]. Jak również po raz pierwszy wykazano, że funkcjonalny system NHEJ komórek gospodarza (*M. smegmatis*) jest niezbędny dla wewnątrzkomórkowego namnażania się fagów Corndog i Omega, a powyższe obserwacje opublikowano w prestiżowym czasopiśmie *Molecular Cell* [Pitcher i wsp., 2006].

Oceniono także rolę systemów naprawy podwójnych pęknięć DNA dla przeżywania prątków wewnątrz makrofagów wykazując, że obecność tylko jednego z badanych systemów, NHEJ i/lub HR, jest wystarczająca dla wewnątrzkomórkowego namnażania prątków gruźlicy [Brzostek i wsp., 2014]. Ponadto wykazano, że mutant pozbawiony białka RecA indukuje silniejszą aktywność bakteriobójczą makrofagów niż szczep kontrolny *M. tuberculosis* czy mutant pozbawiony funkcjonalnych białek systemu NHEJ [Szulc-Kielbik i wsp., 2015].

Genom mykobakterii charakteryzuje się bogactwem prostych i odwróconych sekwencji powtórzonych. Ich obecność może wpływać na tworzenie alternatywnych struktur DNA, a tym samym indukować genetyczne niestabilności genomu prowadzące do uszkodzeń DNA (DSBs). Wykazano, że powstałe w ten sposób uszkodzenia podwójnych nici DNA stymulują

do działania jeden ze szlaków naprawczych obecnych w komórkach *Mycobacterium* (HR, NHEJ lub SAA-single strand annealing) [Wojcik i wsp., 2012].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Korycka-Machala M, **Brzostek A**, Rozalska S, Rumijowska-Galewicz A, Dziedzic R, Bowater R, Dziadek J: Distinct DNA repair pathways involving RecA and nonhomologous end joining in *Mycobacterium smegmatis*. FEMS MICROBIOLOGY LETTERS **2006**; 258 (1): 83-91
2. Pitcher RS, Tonkin LM, Daley, Palmboos PL, Green AJ, Velting TL, **Brzostek A**, Korycka-Machala M, Cresawn S, Dziadek J, Hatfull GF, Wilson TE, Doherty AJ: Mycobacteriophage exploit NHEJ to facilitate genome circularization. MOLECULAR CELL **2006**; 23 (5): 743-748
3. Pitcher RS, Green AJ, **Brzostek A**, Korycka-Machala M, Dziadek J, Doherty AJ: NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation. DNA REPAIR **2007**; 6 (9): 1271-1276
4. Wojcik EA, **Brzostek A**, Bacolla A, Mackiewicz P, Vasquez KM, Korycka-Machala M, Jaworski A, Dziadek J: Direct and Inverted Repeats Elicit Genetic Instability by Both Exploiting and Eluding DNA Double-Strand Break Repair Systems in Mycobacteria. PLOS ONE **2012**; 7 (12) Article Number: e51064 DOI: 10.1371/journal.pone.0051064
5. **Brzostek A**, Szulc I, Klink M, Brzezinska M, Sulowska Z, Dziadek J: Either Non-Homologous Ends Joining or Homologous Recombination Is Required to Repair Double-Strand Breaks in the Genome of Macrophage-Internalized *Mycobacterium tuberculosis*. PLOS ONE **2014**; 9 (3) Article Number: e92799 DOI: 10.1371/journal.pone.0092799
6. Minias AE, **Brzostek AM**, Minias P, Dziadek J: The deletion of *rnhB* in *Mycobacterium smegmatis* does not affect the level of RNase HII substrates or influence genome stability. PLOS ONE **2015**; Jan 20;10(1):e0115521. doi: 10.1371/journal.pone.0115521
7. Szulc-Kielbik I, Brzezinska M, Kielbik M, **Brzostek A**, Dziadek J, Kania K, Sulowska Z, Krupa A, Klink M: *Mycobacterium tuberculosis* RecA is indispensable for inhibition of the mitogen-activated protein kinase-dependent bactericidal activity of THP-1-derived macrophages *in vitro*. FEBS JOURNAL **2015**; 282 (7): 1289-306

4. Miejsca docelowe dla nowych leków przeciwgruźliczych

Oporność prątków na leki jest związana z akumulacją mutacji w genach kodujących miejsca docelowe dla leków (*inhA* i *kasA* – izoniazyd, *rpoB* – rifampicyna, *embCAB* – etambutol) i/lub mutacji w genach kodujących enzymy aktywujące leki (*katG* – izoniazyd, *pncA* – pyrazynamid, *ethA* – etionamid).

Częstość nabywania oporności na pojedynczy lek przeciwgruźliczy spowodowana spontanicznymi mutacjami, waha się od 1 na 10^6 do 1 na 10^8 komórek mykobakterii. Natomiast prawdopodobieństwo pojawienia się szczepu niosącego oporność na trzy leki

jednocześnie wynosi 10^{-18} – 10^{-20} . Niewłaściwie prowadzona terapia, a także zaniedbania ze strony pacjenta mogą znacznie zwiększać ryzyko nabywania oporności przez szczepy *M. tuberculosis*.

Obecnie stosowane leki przeciwprątkowe jako miejsca docelowe najczęściej oddziałują z enzymami uczestniczącymi w biosyntezie ściany komórkowej, enzymami metabolizmu lipidów oraz procesu transkrypcji i translacji.

Biorąc pod uwagę niewielką liczbę skutecznych tuberkulostatyków, które ponadto muszą być nakierowane na procesy metaboliczne krytyczne dla życia prątka, uzasadnionym wydaje się podjęcie badań molekularnych, zmierzających do identyfikacji i charakterystyki szlaków metabolicznych, niezbędnych do prawidłowego wzrostu bakterii. Badania te mają na celu poszukiwanie kolejnych elementów docelowych w komórce prątka dla leków przeciwgruźliczych nowej generacji. Ponadto, w przypadku terapii przeciwgruźliczej, niezwykle ważnym problemem jest słaba penetracja antybiotyków przez osłony komórkowe *M. tuberculosis*. Najbardziej charakterystycznym składnikiem ściany prątków są kwasy mykolinowe. Kwasy mykolinowe stanowią skuteczną barierę dla przenikania do wnętrza komórki związków hydrofobowych i hydrofilowych, w tym wielu chemioterapeutyków, przyczyniając się do częstych niepowodzeń w terapii. Jednocześnie należy nadmienić, że najskuteczniejsze tuberkulostatyki: izoniazyd, pyrazynamid, tiolaktomycyna czy etionamid, działają specyficznie na biosyntezę kwasów mykolinowych.

Miejsce docelowe dla leków przeciwgruźliczych powinno pełnić istotną rolę w podstawowych procesach komórkowych i metabolizmie prątków, a zatem gen kodujący taką tarczę powinien być niezbędny dla przeżycia komórek patogenu. Ponadto białko docelowe nie powinno wykazywać homologii z białkami gospodarza, a także z białkami mikroflory towarzyszącej, której hamowanie mogłoby prowadzić do negatywnych skutków działania leku. Jednocześnie obniżenie poziomu danego białka w komórkach powinno osłabiać wzrost drobnoustrojów. Pośród potencjalnych kandydatów, spełniających powyższe wymagania, jako tarcza docelowa dla leków przeciwgruźliczych jest białko AccD6 (acetylokarboksylaza CoA). Celem prowadzonych przez nas badań było poznanie funkcji enzymu AccD6 w procesie biosyntezy kwasów mykolinowych ściany komórkowej prątków. Powyższe badania dowiodły, że enzym AccD6 jest niezbędny dla prawidłowego wzrostu patogenego szczepu *M. tuberculosis*, a jednocześnie możliwe jest uzyskanie mutantu *M. smegmatis* z niefunkcyjnym genem *accD6*. Ponadto zaobserwowano, że obniżenie ekspresji *accD6* wpływa w sposób istotny nie tylko na osłabienie wzrostu *M. tuberculosis*, ale także zmienia zawartość kwasów mykolinowych i morfologię komórek prątków [Pawelczyk i wsp., 2011].

Poszukiwania zmierzające do identyfikacji właściwych elementów docelowych dla nowych leków przeciwprątkowych prowadzone są nie tylko wśród enzymów uczestniczących w procesie biosyntezy ściany komórkowej *M. tuberculosis*, ale także wśród białek zaangażowanych w inne procesy istotne dla funkcjonowania komórek prątków. W kolejnych badaniach jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych chemioterapeutyków, oceniano enzym niezbędny w procesie replikacji – prymazę DnaG. Skonstruowano mutantu

defektywnego DnaG i wykazano, że enzym ten jest niezbędny dla przeżycia prątków. Mutant *M. smegmatis* pozbawiony funkcjonalnej kopii genu *dnaG* nie był zdolny do wzrostu na podłożu hodowlanym nawet w przypadku nadprodukcji zidentyfikowanych w genomie mykobakteryjnym prymaz z rodziny AEP. Ponadto zaobserwowano, że minimalna ilość białka DnaG jest wystarczająca dla wzrostu i przeżycia prątków [Kuron i wsp., 2014]. Następnym enzymem, który został poddany analizom i mógłby pełnić rolę miejsca docelowego dla tuberkulostatyków jest ligaza A (LigA). Ligazy DNA są enzymami zaangażowanymi we wszystkie procesy związane z metabolizmem DNA tj. naprawa DNA czy replikacja. W genomie *M. tuberculosis* poza NAD⁺ zależną ligazą A stwierdzono także obecność ligaz zależnych od ATP, charakterystycznych dla organizmów eukariotycznych. Z przeprowadzonych badań wynika, że LigA jest niezbędna w komórkach mykobakterii nawet w warunkach nadprodukcji ligaz ATP-zależnych. Jednakże podobnie jak w przypadku prymazy DnaG niski poziom białka LigA był wystarczający dla wzrostu mykobakterii [Korycka-Machala i wsp., 2007].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Korycka-Machala M, Rychta E, **Brzostek A**, Sayer HR, Rumijowska-Galewicz A, Bowater RP Dziadek J: Evaluation of NAD(+)-dependent DNA ligase of mycobacteria as a potential target for antibiotics. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **2007**; 51 (8): 2888-2897
2. Pawelczyk J, **Brzostek A**, Kremer L, Dziadek B, Rumijowska-Galewicz A, Fiolka M, Dziadek J: AccD6, a Key Carboxyltransferase Essential for Mycolic Acid Synthesis in Mycobacterium tuberculosis, Is Dispensable in a Nonpathogenic Strain. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* **2011**; 193 (24): 6960-6972
3. Kuron A, Korycka-Machala M, **Brzostek A**, Nowosielski M, Doherty A, Dziadek B, Dziadek J: Evaluation of DNA Primase DnaG as a Potential Target for Antibiotics. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* **2014**; 58 (3): 1699-1706

5. Wybrane białka *Toxoplasma gondii* jako antygeny szczepionkowe w profilaktycznej, rekombinantowej szczepionce przeciwko toksoplazmozie

Pierwotniak *Toxoplasma gondii*, czynnik etiologiczny toksoplazmozy, należy do grupy wewnątrzkomórkowych pasożytów człowieka i wielu gatunków zwierząt endotermicznych. Mając na uwadze kliniczne i socjoekonomiczne znaczenie toksoplazmozy, determinowane wysokim odsetkiem ludzi na świecie (25-30%) zarażonych tym pasożytniczym pierwotniakiem, a także brak skutecznych narzędzi terapii i immunoprofilaktyki toksoplazmozy podjęto szereg badań mających na celu konstrukcję doświadczalnej, rekombinantowej szczepionki przeciwko tej parazytozie.

W pierwszym etapie prowadzonych doświadczeń wytypowano, jako antygeny szczepionkowe, białka roptrii ROP2 i ROP4 *T. gondii* i oceniono właściwości immunogenne i protekcyjne rekombinantowej dwuskładnikowej, podjednostkowej szczepionki przeciwko

toksoplazmozie z zastosowaniem modelu przewlekłej toksoplazmozy u myszy laboratoryjnych szczepu C3H/HeJ. W tym celu sklonowano geny *rop2* i *rop4* *Toxoplasma* w układzie ekspresyjnym *Escherichia coli*, a oczyszczone za pomocą techniki chromatografii powinowactwa, przy użyciu komercyjnego złoża wysyconego jonami niklu (Ni^{2+}), rekombinantowe białka rROP2 i rROP4 użyto do immunizacji myszy.

Na podstawie wykonanych doświadczeń wykazano, że oba badane antygeny szczepionkowe indukują silną antygenowo swoistą odpowiedź typu humoralnego oraz komórkowego, manifestującą się, odpowiednio, w produkcji swoistych immunoglobulin anty-rROP2 i anty-rROP4, izotypów IgG1 i IgG2a, oraz stymulacji antygenowo swoistej *in vitro* syntezy cytokin typu Th1, IFN- γ i IL-2, i antygenowo swoistej *in vitro* limfoproliferacji. Ponadto, zaobserwowano, iż aktywności immunogennej badanej doświadczalnej szczepionki rROP2+rROP4 towarzyszyło umiarkowane działanie ochronne przed zarażeniem cystotwórczym szczepem DX *T. gondii*, przejawiające się w statystycznie znamionym 46% spadku liczby cyst tkankowych pasożyta w mózgach zwierząt immunizowanych, w porównaniu do ich liczby stwierdzonej u zwierząt kontrolnych [Dziadek i wsp., 2009]. Ponieważ konstrukcja skutecznej szczepionki, wykazującej pełne działanie protekcyjne, wymaga optymalizacji jej składu antygenowego, w kolejnym etapie pracy postanowiono uzupełnić dwuskładnikową szczepionkę o antygen powierzchniowy SAG1 (surface antygen 1) i/lub wydzielniczy antygen granul o dużej gęstości GRA4 (dense granule antygen 4) *T. gondii*. W prezentowanych badaniach oceniono właściwości ochronne i immunogenne trzech rekombinantowych trójskładnikowych szczepionek przeciwko toksoplazmozie zawierających białka rROP2+rGRA4+rSAG1, rROP2+rROP4+rGRA4 i rROP2+rROP4+rSAG1 *Toxoplasma*. Spośród trzech testowanych szczepionek rekombinantowych najsilniejsze działanie immunoprotekcyjne wykazała szczepionka zawierająca antygeny rROP2+rROP4+rSAG1, co wyrażało się w silnej (90%-myszy szczepu C57BL6, 71%-myszy szczepu C3H/HeJ) choć nadal częściowej, redukcji liczby cyst tkankowych szczepu DX *Toxoplasma* w mózgach zwierząt immunizowanych. Wykorzystanie w toku prowadzonych doświadczeń trzech szczepów myszy, różniących się wrodzoną wrażliwością na zarażenie *T. gondii*, pozwoliło stwierdzić, iż działanie immunogenne i immunoprotekcyjne badanych doświadczalnych szczepionek rekombinantowych, zależne było nie tylko od ich składu antygenowego, ale również od genetycznie determinowanej, naturalnej wrażliwości myszy laboratoryjnych na toksoplazmozę. Podobnie jak badana wcześniej szczepionka dwuskładnikowa, rROP2+rROP4, oceniane preparaty zawierające trzy białka pasożyta charakteryzowały się silnym działaniem immunogennym stymulującym zarówno humoralne, jak i komórkowe mechanizmy odpowiedzi immunologicznej [Dziadek i wsp., 2011]. Badania związane z konstrukcją doświadczalnej, podjednostkowej szczepionki przeciwko toksoplazmozie zostały podsumowane w publikacji przeglądowej, przygotowanej na zaproszenie edytorów czasopisma *Bioengineering* [Dziadek i Brzostek, 2012]. W pracy tej przedstawiono także dalsze możliwości i strategie nasilania potencjału ochronnego badanych preparatów.

W toku prowadzonych badań oceniono także przydatność diagnostyczną rekombinantowych białek rROP2 i rROP4, w odniesieniu nie tylko do identyfikacji zarażenia *Toxoplasma*, ale

również różnicowania pomiędzy ostrą a przewlekłą inwazją pasożytniczą. Określenie wartości diagnostycznej rROP2 i rROP4 wykonano z wykorzystaniem techniki immunoenzymatycznej ELISA pozwalającej na określenie poziomu antygenowo swoistych przeciwciał klas IgM i IgG. Przeprowadzone badania wykazały, iż natywne antygeny roptrii ROP2 i ROP4 indukują u zarażonych *T. gondii* myszy silną humoralną odpowiedź immunologiczną, a towarzyszący jej profil syntetyzowanych przeciwciał zależny był od fazy zarażenia. Ponadto, zdolność przeciwciał powstałych w wyniku stymulacji natywnymi antygenami ROP2 i ROP4 do rozpoznawania rekombinantowych białek rROP2 i rROP4 czyni te ostatnie potencjalnymi, interesującymi kandydatami w przypadku opracowywania nowych narzędzi diagnostyki toksoplazmozy [Gatkowska i wsp., 2010].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Dziadek B, Gatkowska J, **Brzostek A**, Dziadek J, Dzitko K, Długowska H: *Toxoplasma gondii*: The immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY* **2009**; 123 (1): 81-89
2. Gatkowska J, Dziadek B, **Brzostek A**, Dziadek J, Dzitko K, Długowska H: Determination of Diagnostic Value of *Toxoplasma gondii* Recombinant ROP2 and ROP4 Antigens in Mouse Experimental Model. *POLISH JOURNAL OF MICROBIOLOGY* **2010**; 59 (2): 137-141
3. Dziadek B, Gatkowska J, **Brzostek A**, Dziadek J, Dzitko K; Grzybowski M, Długowska H: Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. *VACCINE* **2011**; 29 (4): 821-830
4. Dziadek B, **Brzostek A**: Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis What's next? *BIOENGINEERED* **2012**; 3 (6): 358-364

6. Podziały komórkowe u *Mycobacterium*

Podziały komórkowe są fundamentalnym i złożonym procesem życiowym każdej żywej komórki pro- i eukariotycznej. Proces ten został najlepiej poznany na modelowym gatunku prokariotycznym *E. coli*. W wyniku podziału komórki powstają dwie komórki potomne, identyczne pod względem materiału genetycznego z komórką macierzystą. Proces ten poprzedzony jest replikacją DNA, a następnie rozpoczyna się tworzenie przegrody międzykomórkowej. Najważniejszym białkiem w podziale komórkowym u większości organizmów prokariotycznych jest białko FtsZ, homolog eukariotycznej tubuliny, które pełni ważną rolę w inicjowaniu procesu podziału komórkowego. Białko FtsZ ulega polimeryzacji, co prowadzi do utworzenia pierścienia Z i wytworzenia przegrody, która bierze udział w rozdzieleniu komórek. Pierścień Z podlega działaniu różnych regulatorów, które modulują pośrednio lub bezpośrednio aktywność FtsZ. Pośród nich są białka FtsA, ZipA, ZapA, Slm,

SulA, YneA, Noc, EzrA, CrgA i ClpX. U *Mycobacterium* zidentyfikowano jedynie homologii dla ClpX, CrgA i białko podobne do YneA (ChiZ).

W prezentowanej pracy podjęto się określenia roli białka ClpX w podziałach komórkowych *M. tuberculosis*. Zaobserwowano, że *clpX* ulega podwyższonej ekspresji w zakażonych makrofagach, a także pod wpływem działania cefaloxinu, konsekwencją tego jest opóźnienie wytworzenia pierścienia Z. Jednocześnie, wykazano poprzez zastosowanie różnych metod biologii molekularnej (pull-down, bakteryjny system dwuhybrydowy, test komplementacji mykobakteryjnych fragmentów białek), że FtsZ oddziałuje stechiometrycznie z ClpX, a inkubacja obu białek prowadzi do podwyższenia stężenia polimeryzacji FtsZ. Nadprodukcja białka ClpX powoduje zwiększenie długości komórek mykobakteryjnych i lokalizuje FtsZ w środku komórki. Przedstawione wyniki sugerują, że ClpX negatywnie reguluje aktywność FtsZ w czasie wewnątrzkomórkowego wzrostu prątków i wpływa tym samym na ich podział komórkowy [Dziedzic i wsp., 2010].

Z podziałami komórkowymi ma związek proces segregacji chromosomów, który także jest ściśle połączony z replikacją DNA. Pośród dużej liczby białek uczestniczących w segregacji chromosomów, dla ParA i ParB zostały zidentyfikowane homologii u wielu przedstawicieli gatunków bakteryjnych, w tym także dla wolno- i szybko-rosnących gatunków *Mycobacterium*. Wcześniej prowadzone badania na różnych gatunkach bakterii wskazują na oddziaływanie pomiędzy ParB a sekwencjami ParS zlokalizowanymi wokół miejsca inicjacji replikacji *oriC*, co prowadzi do utworzenia dużego kompleksu nukleoproteinowego zwanego segregosomem. Natomiast białko ParA oddziałuje z segregosomem poprzez bezpośredni kontakt z białkiem ParB.

W prezentowanej pracy wykazano, że gen *parB* *M. smegmatis* nie jest niezbędny do wzrostu szybko-rosnących prątków. Z tego względu możliwe było otrzymanie mutantu pozbawionego funkcjonalnego białka ParB. Jednocześnie szczep $\Delta parB$ wykazywał odmienny fenotyp w porównaniu do szczepu kontrolnego, co objawiało się osłabieniem wzrostu szczepu mutantu, a także błędami w segregacji chromosomów polegającymi na obecności ok. 10% komórek pozbawionych materiału genetycznego. Szczep *M. smegmatis* z nadprodukcją ParB również odznaczał się osłabionym wzrostem na podłożu hodowlanym, ale nie wykazywał różnic związanych z segregacją chromosomów. Ponadto dowiedziono, że ParA oddziałuje bezpośrednio z ParB, to z kolei pozwala na oddziaływanie ParB z DNA, a w szczególności z sekwencjami ParS. Na tej podstawie wnioskuje się, że ParA, ParB i ParS są zaangażowane w proces tworzenia mykobakteryjnego kompleksu segregacyjnego w regionie *oriC* [Jakimowicz i wsp., 2007].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Jakimowicz D, Brzostek A, Rumijowska-Galewicz A, Zydek P, Dołzbłasz A, Smulczyk-Krawczynszyn A, Zimniak T, Wojtasz L, Zawilak-Pawlik A, Kois A, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwinska J: Characterization of the mycobacterial chromosome segregation protein ParB and identification of its target in *Mycobacterium smegmatis*. MICROBIOLOGY-SGM 2007; 153: 4050-4060

2. Dziejic R, Kiran M, Plocinski P, Ziolkiewicz M, **Brzostek A**, Moomey M, Vadrevu IS, Dziadek J, Madiraju M, Rajagopalan M: *Mycobacterium tuberculosis* ClpX Interacts with FtsZ and Interferes with FtsZ Assembly. PLOS ONE 2010; 5 (7) Article Number: e11058 DOI: 10.1371/journal.pone.0011058

7. Regulacja metabolizmu węglowego u *Mycobacterium*

Biorąc pod uwagę rosnącą liczbę dowodów sugerujących ważną rolę kwasów tłuszczowych i cholesterolu w infekcji komórek gospodarza przez prątki *M. tuberculosis*, geny kodujące enzymy β oksydacyjne wraz z liazą izocytrynianową (*icl1*) i syntazą metylocytrynianową (*prpC*), które są zaangażowane w cykle anaplerotyczne, ulegają odmiennej regulacji w zakażonych makrofagach i zainfekowanych myszach. Zaobserwowano, że degradacja parzystołańcuchowych kwasów tłuszczowych prowadzi do utworzenia acetylo CoA, podczas gdy produktem metabolizmu nieparzystołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest dodatkowo propionilo CoA. Również w trakcie degradacji cholesterolu powstają acetylo CoA i propionilo CoA, które dalej są metabolizowane na drodze cyklu gliksalowego i metylocytrynianowego. W przypadku gdy cholesterol lub kwasy tłuszczowe są jedynym źródłem węgla i energii dla prątków gruźlicy to oba szlaki metaboliczne są potrzebne do przeżycia bakterii. Wykazano, że operon *prpD(B)C* *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* jest niezbędny do wzrostu prątków na podłożu z propionianem jako jedynym źródłem węgla. Ponadto dalsza degradacja propionianu jest ważna z uwagi na fakt, że jest on związkiem toksycznym i wpływa na zahamowanie wzrostu bakterii. Dlatego też funkcjonalny szlak metylocytrynianowy jest ważny dla wzrostu mykobakterii w obecności propionianu jako źródła węgla. Jak dotąd niewiele wiadomo na temat regulacji ekspresji genów *icl1* lub *prpDC* podczas wzrostu prątków gruźlicy w różnych warunkach środowiska. Jednym z ostatnio scharakteryzowanych czynników transkrypcyjnych jest RamB, który łączy się z regionem promotorowym *icl1* i prowadzi do zahamowania jego ekspresji w szczepie *M. tuberculosis* hodowanym na podłożu z dodatkiem glukozy.

W prezentowanej pracy po raz pierwszy zidentyfikowano otwartą ramkę odczytu kodującą przypuszczalnie regulator transkrypcji genów operonu *prpDC* *M. tuberculosis*, nazwany *prpR*, który podlega także autoregulacji. Zaobserwowano, że ekspresja genów *prpR*, *prpDC*, jak i *icl1*, jest aktywowana przez czynnik sigma-E (σ^E) polimerazy RNA, w odpowiedzi na detergenty, pośredniczące w stresie komórkowym. Wykorzystując techniki EMSA, DNA-footprinting, powierzchniowy rezonans plazmonowy (SPR) opisano interakcje pomiędzy białkiem PrpR a regionami promotorowymi genów *prpDC*, *icl1* oraz *ramB*. Ponadto dowiedziono funkcji białka PrpR w regulacji ekspresji wspomnianych genów *M. tuberculosis* hodowanego na podłożu zawierającym różne źródła węgla. W warunkach wzrostu szczepu na podłożu z propionianem jako jedynym źródłem węgla obserwowano zdecydowanie wyższy poziom ekspresji *prpR*. Dodatkowo wykazano interakcję PrpR z regionem promotorowym genu *kstR*, regulującym ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm

cholesterolu, sugerując udział regulatora PrpR podczas wzrostu prątków na podłożu z cholesterolem [Masiewicz i wsp., 2012].

Z uwagi na zwiększony poziom ekspresji *prpR* w makrofagach i myszach zakażonych prątkami gruźlicy przypuszcza się, że białko PrpR może odrywać kluczową rolę w adaptacji *M. tuberculosis* do różnych warunków środowiska w czasie infekcji komórek gospodarza.

W kolejnej pracy pokazano po raz pierwszy, że PrpR wpływa na regulację ekspresji genu *dnaA*, którego produkt odpowiada za proces inicjacji replikacji chromosomu. Ponadto dowiedziono za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), że jednocześnie PrpR działa jako represor transkrypcji *dnaA* w czasie wzrostu bakterii na podłożu z propionianem jako jedynym źródłem węgla. Podsumowując, istnieje przypuszczenie, że PrpR może być ważnym elementem wieloskładnikowego systemu regulatorowego prątków gruźlicy ważnego dla ich wewnątrzkomórkowego przeżywania w makrofagach [Masiewicz i wsp., 2014].

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

1. Masiewicz P, **Brzostek A**, Wolanski M, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwinska J: A Novel Role of the PrpR as a Transcription Factor Involved in the Regulation of Methylcitrate Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. PLOS ONE, **2012**; 7 (8) Article Number: e43651 DOI: 10.1371/journal.pone.0043651
2. Masiewicz P, Wolanski M, **Brzostek A**, Dziadek J, Zakrzewska-Czerwinska J: Propionate represses the *dnaA* gene via the methylcitrate pathway-regulating transcription factor, PrpR, in *Mycobacterium tuberculosis*. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY. **2014**; 105 (5): 951-959

8. Pierwsze próby zastosowania metod biologii molekularnej do pracy z szybko rosnącymi szczepami <i>Mycobacterium</i>
--

Badania molekularne prątków gruźlicy wymagają specyficznego, dedykowanego warsztatu naukowego, który rozwinął się dopiero w początkach lat 90-tych ubiegłego wieku. Dlatego też prace z tego okresu dotyczyły głównie opracowywania nowych metod pozwalających na skuteczne manipulacje genetyczne u tych drobnoustrojów.

Publikacje habilitanta dotyczące tej tematyki

Przed doktoratem

1. Dziadek J, Sajduda A, Golanska E, **Brzostek A**, Jaworski A: Methods of introduction of foreign DNA into mycobacteria. ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA **1994** Volume: 43 Issue: 2 Pages: 233-239
2. Sajduda A, **Brzostek A**, Dziadek J: Sondy genetyczne w diagnostyce i epidemiologii zakażeń *Mycobacterium*, Postępy Mikrobiologii **1995**, XXXVI (1): 3-16
3. Dziadek J, **Brzostek A**, Parniewski P, Jaworski A: Retrony- retroelementy bakterii. Postępy Mikrobiologii **1997**, XXXVI (1):1-17

4. Płuciennik A, **Brzostek A**, Boruń M, Sasiak A, Jaworski A: Postreplikacyjne systemy naprawy błędów DNA. *Postępy Mikrobiologii* **1997**, XXXVI (2):143-166

Po doktoracie

1. Golańska E, **Brzostek A**, Kiatpapan P, Dziadek J: Characterisation of a new host-vector system for fast-growing mycobacteria. *ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA* **1998**; 47(4):335-43
2. **Brzostek A**, Popławski T, Murooka Y, Dziadek J: Geny i enzymy uczestniczące w przekształceniach struktury pierścieniowej steroidów. *Biotechnologia* **1998**; 2(41):67-85
3. **Brzostek A**, Pawłowicz M, Dziadek J: The DNA probe and PCR assay as useful tools to control an acid fast bacteria-dependent biotechnological process. *ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA* **2001**; 50(1):37-44

