

Autoreferat

dr Anna Grzegorzewicz

13 Maj 2018

Załącznik 2. Autoreferat

1. Anna Grzegorzewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe / artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2003 doktor nauk biologicznych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, rozprawa doktorska pt. „Powierzchniowe składniki osłon komórkowych wybranych aktynobakterii”, promotor: prof. dr hab. Andrzej Gamian

1995 magister biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, praca magisterska pt. „Poszukiwanie aktywności fosfolipazy A₂ w macierzy jądrowej i jej białkowych składnikach”, promotor: prof. dr hab. Arkadiusz Kozubek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2016- Uniwersytet Stanowy Kolorado, Fort Collins, USA, asystent (research scientist II)

2011-2016 Uniwersytet Stanowy Kolorado, Fort Collins, USA, asystent (research scientist I)

2004-2011 Uniwersytet Stanowy Kolorado, Fort Collins, USA, staż podoktorski

1998-2004 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent

1997-1998 Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu, asystent techniczny

4. Opis osiągnięcia 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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Osiągnięciem w myśl ww. ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl sześciu publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 5, objęty tytułem:

„Molekularne mechanizmy działania nowych leków przeciwgruźliczych”

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

- 1. Grzegorzewicz A.E.,** Ma Y., Jones V., Crick D., Liav A., McNeil MR. Development of a microtitre plate-based assay for lipid-linked glycosyltransferase products using the mycobacterial cell wall rhamnosyltransferase WbbL. **Microbiology**, 2008, 154, 3724-30. **IF¹: 2,841 /MNiSW²: 24 / Liczba cytowań³: 9**
- 2. Grzegorzewicz A.E.,** Pham H., Gundi V.A., Scherman M.S., North E.J., Hess T., Jones V., Gruppo V., Born S.E., Korduláková J., Chavadi S.S., Morisseau C., Lenaerts A.J., Lee R.E., McNeil M.R., Jackson M. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. **Nat. Chem. Biol.**, 2012, 8, 334-41. **IF: 12,948 /MNiSW: 50 / Liczba cytowań: 161**
- 3. Grzegorzewicz A.E.,** Korduláková J., Jones V., Born S.E., Belardinelli J.M., Vaquié A., Gundi V.A., Madacki J., Slama N., Laval F., Vaubourgeix J., Crew R.M., Gicquel B., Daffé M., Morbidoni H.R., Brennan P.J., Quémar A., McNeil M.R., Jackson M. A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. **J. Biol. Chem.**, 2012, 287, 38434-41. **IF: 4,651 /MNiSW: 35 / Liczba cytowań: 39**
- 4. Favrot L., Grzegorzewicz A.E.,** Lajiness D.H., Marvin R.K., Boucau J., Isailovic D., Jackson M., Ronning D.R. Mechanism of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by ebselen. **Nat. Commun.**, 2013, 4, 2748. **IF: 12,03 /MNiSW: 45 / Liczba cytowań: 40**
- 5. Grzegorzewicz A.E.,** Eynard N., Quémar A., North E.J., Margolis A., Lindenberger J.J., Jones V., Korduláková J., Brennan P.J., Lee R.E., Ronning D.R., McNeil M.R., Jackson M. Covalent modification of the *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratase by Isoxyl and thiacetazone. **ACS Infect. Dis.** 2015, 13, 91-97. **IF: 3,6 /MNiSW⁴: / Liczba cytowań: 9**
- 6. Grzegorzewicz A.E.,** de Sousa-d'Auria C., McNeil M.R., Huc-Claustre E., Jones V., Petit C., Angala S.K., Zemanová J., Wang Q., Belardinelli J.M., Gao Q., Ishizaki Y., Mikušová K., Brennan P.J., Ronning D.R., Chami M., Houssin C., Jackson M. Assembling of the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall core. **J. Biol. Chem.**, 2016, 291, 18867-79. **IF: 4,125 /MNiSW: 35 / Liczba cytowań: 7**

¹ Wartość współczynnika wpływu (Impact Factor), zgodnie z rokiem opublikowania.

² Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.

³ Liczba cytowań (z uwzględnieniem autocytaowań), według bazy Web of Science, stan z dn. 02.05.2018r.

⁴ Brak danych

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

Cel naukowy

Opracowanie nowych leków przeciwgruźliczych opartych na zahamowaniu biosyntezy osłon komórkowych *Mycobacterium tuberculosis*.

PRZEDSTAWIONY CYKL PRAC OBEJMUJE ZAGADNIENIA BADAWCZE, STANOWIĄCE PRZEDMIOT MOICH ZAINTERESOWAŃ NAUKOWYCH:

- charakterystyka enzymów biorących udział w biosyntezie osłon komórkowych *Mycobacterium tuberculosis*,
- identyfikacja związków hamujących syntezę osłon komórkowych *Mycobacterium tuberculosis* oraz określenie mechanizmu ich działania,
- badanie mechanizmów oporności leków przeciwgruźliczych,
- opracowanie testów do identyfikacji inhibitorów osłon komórkowych *M. tuberculosis*.

Wprowadzenie

Gruźlica należy do najbardziej rozpowszechnionych chorób zakaźnych na Ziemi. Mimo dostępności skutecznej terapii, ocenia się, że rocznie na gruźlicę choruje około 9 milionów osób, a umiera 1,7 miliona. W Polsce w roku 2017 odnotowano 7100 zachorowań na gruźlicę⁵. W ostatniej dekadzie liczba przypadków gruźlicy w Polsce zmniejszyła się o 30 %, ciągle jednak jest wyższa niż w innych krajach Unii Europejskiej⁶.

Czynnikiem etiologicznym gruźlicy jest prątek gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), zidentyfikowany przez Roberta Kocha w 1882r. Gruźlica przenosi się przede wszystkim drogą kropelkową. Prątki lokalizują się w makrofagach pęcherzyków płucnych. W wyniku uruchomienia mechanizmów obronnych dochodzi do samoograniczenia infekcji poprzez utworzenie typowych dla gruźlicy ziarnin, w których prątki mogą przetrwać w stanie uśpienia przez wiele lat. Zakażenie zatem nie jest równoznaczne z rozwinięciem aktywnej choroby i może pozostawać bezobjawowe. Tylko około 10 % osób zakażonych zachoruje, w tym 5 % w okresie dwóch lat po zetknięciu z prątkiem gruźlicy. Czynniki sprzyjającymi uaktywnieniu się choroby są między innymi: zakażenie wirusem HIV, choroby nowotworowe, cukrzyca, niedożywienie, alkoholizm, młody i starszy wiek.

Farmakoterapia gruźlicy

⁵ World Health Organization. Global tuberculosis report. WHO Report 2017, Geneva.

⁶ Korzeniewska-Koseła M. Tuberculosis in Poland in 2015. Przegl Epidemiol. 2017, 71, 391-403

Przedmiotem moich zainteresowań naukowych jest farmakoterapia gruźlicy. Gruźlica towarzyszy człowiekowi od początku jego historii. Przed wynalezieniem antybiotyków, gruźlicę leczono sanatoryjnie lub chirurgicznie. Jednak takie metody leczenia rzadko kiedy skutkowały wyzdrowieniem chorego. Pierwszy skuteczny lek przeciwko gruźlicy - streptomycynę, wprowadzono dopiero po II wojnie światowej. Bardzo szybko pojawiły się pierwsze szczepy prątków gruźlicy odporne na ten antybiotyk i leczenie nie przynosiło oczekiwanych efektów. Cechą charakterystyczną *M. tuberculosis* jest łatwość nabywania oporności i dlatego, w celu osiągnięcia pozytywnych efektów terapeutycznych niezbędne jest zastosowanie terapii wielolekowej. Wynalezienie w latach 50-tych i 60-tych 20-tego wieku kolejnych antybiotyków, tj.: izoniazydu, etambutolu, rifampicyny, pyrazynamidu i etionamidu, pozwoliło na opracowanie skutecznej terapii przeciwgruźliczej. W ostatnich latach obserwuje się wzrastającą zapadalność na gruźlicę wielolekooporną z opornością co najmniej na rifampicynę i izoniazyd (MDR-TB, multidrug resistant tuberculosis) oraz gruźlicę z lekoopornością wielolekową (XDR-TB, extensively drug resistant tuberculosis) o rozszerzonej oporności prątków na rifampicynę, izoniazyd, chinolony oraz przynajmniej na jeden z antybiotyków podawanych parenteralnie (kanamycyna, akamikacyna lub kapreomycyna).

Leczenie gruźlicy wielolekoopornej jest długie, kosztowne i bardzo często kończy się niepowodzeniem. Kolejnym problemem są interakcje pomiędzy lekami antywirusowymi, stosowanymi u chorych zakażonych wirusem HIV, a lekami przeciwgruźliczymi. Leczenie gruźlicy wielolekoopornej wymaga zastosowania dodatkowych antybiotyków między innymi z grupy aminoglikozydów, chinolonów i polipeptydów⁷.

Istnieje kilka przyczyn wysokiej śmiertelności spowodowanej gruźlicą. Obecnie stosowana szczepionka BCG ma ograniczoną skuteczność, nie zapobiega zakażeniu, a jedynie wpływa na obniżenie częstości ciężkich postaci gruźlicy u dzieci⁸. Jednym z podstawowych problemów jest długość trwania terapii przeciwgruźliczej. Leczenie gruźlicy lekowrażliwej prowadzi się od 6. do 9. miesięcy. W wypadku gruźlicy wielolekoopornej terapia, warunkująca całkowite wyleczenie, trwa od 18. do 24. miesięcy. Leki przeciwgruźlicze mają często działanie niepożądane uniemożliwiające normalne funkcjonowanie chorego. Z tego względu chorzy przerywają terapię, co z kolei przyczynia się do powstania szczepów opornych. Stosowanie terapii wielolekowej w leczeniu gruźlicy nie wynika jedynie z łatwości nabywania oporności przez te bakterie. Prątki znajdujące się w płucach nie stanowią jednolitej populacji i mogą być zlokalizowane zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowo. Ponadto można wyróżnić prątki aktywnie namnażające się oraz będące w stanie uśpienia. Ze względu na obniżoną aktywność metaboliczną, prątki będące w stanie uśpienia charakteryzują się obniżoną wrażliwością na antybiotyki działające na prątki aktywnie namnażające się. Wśród obecnie stosowanych leków przeciwgruźliczych znajdują się między innymi inhibitory działające na syntezę osłon komórkowych (izoniazyd, etionamid, etambutol, perchlozone), syntezę białek (aminoglikozydy), replikację (chinolony), transkrypcję (rifampicina), syntezę ATP (bedaquiline) i o złożonym mechanizmie działania (pyrazynamid)⁹.

W celu identyfikacji związków prątkobójczych stosuje się dwie różne metody. Pierwsza z nich opiera się na wyszukiwaniu inhibitorów konkretnych enzymów w testach przesiewowych o wysokiej

⁷ Michałowska-Mitczuk D. Farmakoterapia gruźlicy. Postępy Farmakoterapii. 2009, 65, 51-58

⁸ Aagaard C, Dietrich J, Doherty M, Andersen P. TB vaccines: current status and future perspectives. Immunol. Cell Biol, 2009; 87, 279-286.

⁹ Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips P.P, Cole ST, Abubakar I, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. Lancet Infect Dis. 2014, 14, 327-40.

przepustowości. Często inhibitory zidentyfikowane w ten sposób nie wykazują aktywności w stosunku do aktywnie rosnących prątków gruźlicy. Może to być spowodowane na przykład tym, że dany związek nie może przeniknąć przez osłony komórkowe i dotrzeć do enzymu, który hamuje. Druga metoda polega na testowaniu aktywności dużej ilości związków chemicznych w stosunku do aktywnie rosnących *M. tuberculosis*. Wadą tej metody jest brak informacji na temat mechanizmu działania odkrytego inhibitora, a wiedza taka jest potrzebna do molekularnego projektowania leków.

Obecne podejście do leczenia gruźlicy koncentruje się na poszukiwaniu i opracowywaniu leków przeciwgruźliczych o nowych mechanizmach działania, które działałyby na różne populacje *M. tuberculosis*. Ponadto, prowadzone są również badania mające na celu poznanie mechanizmu działania znanych już leków przeciwgruźliczych, gdyż dogłębne zrozumienie mechanizmów ich działania pozwoli na opracowanie innych leków o podobnej skuteczności, ale odznaczających się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi oraz mniejszą toksycznością. Niezwykle ważnym jest również opracowanie skutecznej kombinacji antybiotyków, które odznaczałyby się działaniem synergistycznym

Istotnym zagadnieniem jest także poznanie mechanizmów oporności dzięki którym prątek gruźlicy staje się niewrażliwy na stosowane antybiotyki. W leczeniu gruźlicy bierze się również pod uwagę alternatywne metody terapeutyczne, tj. zastosowanie bakteriofagów. Badania nad bakteriofagami mikobakterii są prowadzone w celu ich bezpośredniego zastosowania w terapii gruźlicy. Ponadto enzymy bakteriofaga działające litycznie na komórki mikobakterii mogą przyczynić się do wynalezienia nowych terapeutyków działających na osłony komórkowe tych bakterii¹⁰.

Wiele leków, stosowanych obecnie w terapii gruźlicy, hamuje syntezę osłon komórkowych prątków gruźlicy. Osłony komórkowe *M. tuberculosis*, odznaczające się unikatową strukturą i składem, stanowią barierę chroniącą prątki przed działaniem czynników środowiskowych oraz ograniczającą działanie wielu antybiotyków, zarówno o właściwościach hydrofilowych jak i hydrofobowych. Modyfikacje osłon komórkowych *M. tuberculosis* są przyczyną zmienionej wrażliwości tej bakterii na antybiotyki.

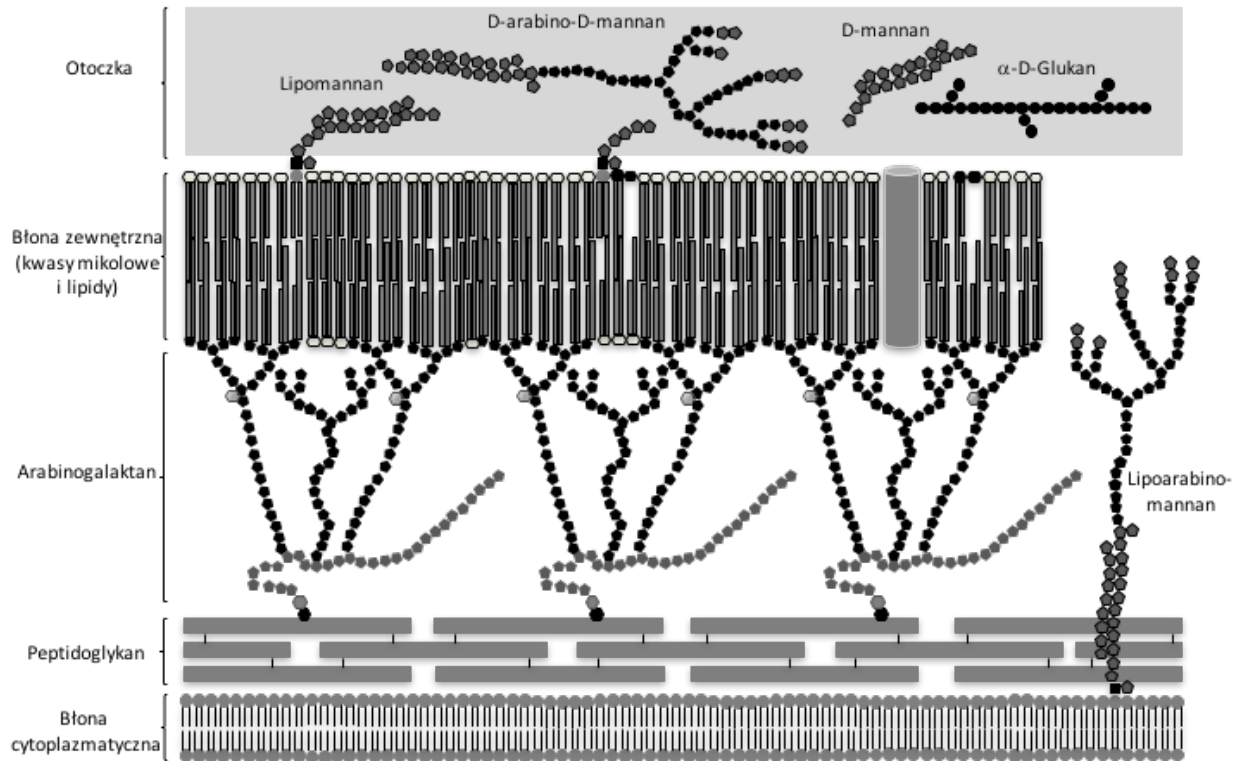
Przedstawiony jednotematyczny cykl publikacji zawiera wyniki badań mających na celu opracowanie nowych leków przeciwgruźliczych opartych na zahamowaniu syntezy osłon komórkowych *M. tuberculosis*.

Oslony komórkowe *M. tuberculosis*

Oslony komórkowe *M. tuberculosis* posiadają wielowarstwową strukturę. Najbardziej wewnętrzną warstwą jest błona cytoplazmatyczna która, podobnie jak u innych bakterii, jest utworzona z dwuwarstwy lipidowej i białek. Na zewnątrz błony cytoplazmatycznej znajduje się szkielet ściany komórkowej, który tworzy kompleks peptydoglikanu z kowalencyjnie związanym arabinogalaktanem, estryfikowanym przez (C₆₀-C₉₀) α - rozgałęzione β -hydroksylowe kwasy mikołowe. Z kompleksem tym zasocjowane są lipidy i lipoglikany. Najczęściej występującymi lipidami są mannozydy fosfatydyloinozytolu, acylowane pochodne trehalozy i sulfolipidy. Lipoglikanami charakterystycznymi dla *M. tuberculosis* są lipoarabinomannan i lipomannan. Kwasy mikołowe kowalencyjnie związane z arabinogalaktanem wraz lipidami i lipoglikanami tworzą asymetryczną błonę zewnętrzną, stanowiącą barierę dla wielu antybiotyków. Najbardziej zewnętrzną warstwą osłon komórkowych *M. tuberculosis* jest otoczka zbudowana z polisacharydów oraz

¹⁰ Gil F, Grzegorzewicz AE, Catalão MJ, Vital J, McNeil MR, Pimentel M. Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 2010, 156, 1497-504.

mniejszej ilości białek i lipidów. Mimo że *M. tuberculosis* należy do bakterii Gram-dodatnich, w osłonach komórkowych tych bakterii występuje, podobnie jak u bakterii Gram-ujemnych, błona zewnętrzna i przestrzeń peryplazmatyczną¹¹ (Ryc.1).



Rycina 1. Schemat osłon komórkowych *M. tuberculosis*¹²

Peptydoglikan

Peptydoglikan (mureina) spełnia funkcje mechaniczne zapewniając komórce ochronę przed skutkami zmiany ciśnienia osmotycznego oraz urazami. Fizyczne właściwości peptydoglikanu, tj. elastyczność i wytrzymałość na rozciąganie, pozwalają na utrzymanie wewnątrzkomórkowego turgoru niezbędnego do prawidłowego metabolizmu, wzrostu i podziału komórki. Peptydoglikan *M. tuberculosis* zaliczany do typu A1 γ podobnie jak peptydoglikan *E. coli*, jest heteropolimerem cukrowym składającym się z ułożonych na przemian cząsteczek *N*-acetyloglukozaminy (GlcNAc) i kwasu *N*-acetylmuraminowego (MurNAc)

¹¹ Angala SK, Belardinelli JM, Huc-Claustre E, Wheat WH, Jackson M. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014, 49, 361-99.

¹² Grzegorzewicz A.E., Jackson M. Subfractionation and analysis of the cell envelope (lipo)polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Mol. Biol., 2013, 966, 309-24.

¹³ Pavelka Jr MS, Mahapatra S, Crick DC. Genetics of peptidoglycan biosynthesis. Microbiol Spectrum. 2014, 2: MGM2-0034-2013.

połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. U prątków grupa *N*- acetylowa kwasu muraminowego może być zastąpiona grupą *N*-glikolilową, co wiąże się z opornością na lizozym. Podjednostki kwasu muraminowego mają przyłączony do reszty mleczanowej peptyd, który jest syntetyzowany w formie pentapeptydu. W najczęściej spotykanej sekwencji pentapeptydu w pozycji pierwszej występuje L-alanina, następnie kwas D-glutaminowy, kwas mezo-diaminopimelinowy i *D*-alanina w pozycji 4 i 5. Wiązania poprzeczne między sąsiednimi łańcuchami peptydowymi są najczęściej tworzone pomiędzy dwoma kwasami mezo-diaminopimelinowymi znajdującymi się w pozycji 3 lub pomiędzy kwasem mezo-diaminopimelinowym i alaniną w pozycji 4. Synteza peptydoglikanu prątków gruźlicy nie różni się znacznie od syntezy peptydoglikanu innych bakterii Gram-dodatnich i rozpoczyna się od syntezy prekursora - UDP-*N*-acetylmuramoilopentapeptydu w cytoplazmie.

Za syntezę UDP-MurNAc z UDP-GlcNAc odpowiadają dwa enzymy MurA (Rv1315) i MurB (Rv0482). Do UDP-MurNAc przyłączane są trzy aminokwasy w reakcjach katalizowanych przez ligazy. Pozostałe dwie cząsteczki alaniny są przyłączane w postaci dwupeptydu, którego synteza jest katalizowana przez racemazę alaninową (Alr, Rv3423) oraz ligazę *D*-alanylo-*D*-alaninową (DdIA, Rv2981c). W następnej fazie prekursor ten jest przenoszony do lipidowego nośnika, fosforanu dekaprenylu (DP) z równoczesnym przyłączeniem GlcNAc. Na tym etapie przeprowadzane są również modyfikacje aminokwasów (amidacja, metylacja, glikozylacja) oraz utlenienie grupy *N*-acetylowej MurNAc do grupy *N*-glikolilowej. W trzeciej fazie następuje translokacja prekursora do peryplazmatycznej strony błony cytoplazmatycznej, przyłączenie go do istniejącej mureiny oraz tworzenie wiązań poprzecznych w reakcjach katalizowanych przez transpeptydazy¹³. Zahamowanie syntezy peptydoglikanu prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. Wśród obecnie stosowanych leków przeciwgruźliczych działających na syntezę peptydoglikanu należy wymienić cykloserynę hamującą przemianę *L*-alaniny w *D*-alaninę przez racemazę alaninową (Alr) oraz tworzenie *D*-alanylo-*D*-alaniny przez ligazę (DdIA)¹⁴. Modyfikacje enzymów przeprowadzających syntezę peptydoglikanu warunkują oporność na antybiotyki. Fosfomicyna posiada hamującą aktywność w stosunku do MurA. Lek ten hamuje aktywność tego enzymu poprzez związanie się z jego cysteiną znajdującą się w centrum aktywnym, w wyniku czego zostaje utworzony nieaktywny kompleks enzym-inhibitor. Prątki gruźlicy są odporne na działanie tego leku, gdyż w miejscu cysteiny, do której wiąże się fosfomicyna występuje kwas asparaginowy¹⁵. U większości bakterii antybiotyki β -laktamowe inaktywują białko wiążące penicylinę posiadające aktywność *D,D*-transpeptydazy i przeprowadzające reakcję utworzenia wiązania peptydowego pomiędzy końcowymi fragmentami łańcucha peptydowego peptydoglikanu. Prątki są chronione przed działaniem antybiotyków β -laktamowych, ponieważ oprócz *D,D*-transpeptydaz posiadają również *L,D*-transpeptydazy, które nie są wrażliwe na ich działanie¹⁶. Z grupą hydroksylową szóstego węgla kwasu muraminowego peptydoglikanu połączony jest wiązaniem fosfodiesterowym łańcuch galaktanowy arabinogalaktanu poprzez tzw. odcinek kotwiczący [\rightarrow Rhap-

¹⁴ Bruning JB, Murillo AC, Chacon O, et al. Structure of the Mycobacterium tuberculosis D-alanine:D-alanine ligase, a target of the antituberculosis drug D-cycloserine. Antimicrob Agents Chemother. 2011, 55, 291–301.

¹⁵ Moraes, G L, Gomes, GC, Monteiro de Sousa, PR, Alves, CN., Govender, T, Kruger, HG., et al. Structural and functional features of enzymes of Mycobacterium tuberculosis peptidoglycan biosynthesis as targets for drug development. Tuberculosis. 2015, 95, 95–111

¹⁶ Lavollay M, Arthur M, Fourgeaud M, et al. The peptidoglycan of stationary-phase Mycobacterium tuberculosis predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. J Bacteriol. 2008, 190, 4360–6.

(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→fosfor)¹⁷. Przez długi czas nie można było zidentyfikować enzymu (ligazy) przeprowadzającego połączenie peptydoglikanu z arabinogalaktanem. W ostatnich latach scharakteryzowano u *M. tuberculosis* dwa białka CpsA1 (Rv3267) i CpsA2(Rv3484) należące do rodziny białek LytR-Cps2A-Psr (LCP) katalizujących reakcje przeniesienia glikopolimerów, tj. kwasów tejchojowych bakterii Gram-dodatnich. Stosując metody biochemiczne i genetyczne udowodniono, że CpsA1 i CpsA2 są odpowiedzialne za ligację peptydoglikanu i arabinogalaktanu. Ciągłe pozostaje do wyjaśnienia na jakim etapie syntezy peptydoglikanu i arabinogalaktanu dochodzi do połączenia tych heteropolimerów. Do tej pory nie udało się wyizolować szczepów prątków gruźlicy pozbawionych arabinogalaktanu, co wskazują na to, że polimer ten jest niezbędnym elementem strukturalnym osłon komórkowych. Dlatego zahamowanie przyłączenia arabinogalaktanu do peptydoglikanu powinno doprowadzić do śmierci komórki bakteryjnej. W związku obecnością u *M. tuberculosis* dwóch białek pełniących funkcję ligazy, inhibitory tego etapu biosyntezy ściany komórkowej powinny hamować aktywność obu enzymów. Opierając się na obserwacji, że mutant, w którym dokonano delekcji białka CpsA1 posiadał zwiększoną wrażliwość na rifampicynę, CPZEN-45 i penicylinę, wydaje się że zahamowanie tylko białka CpsA1 powinno doprowadzić do zwiększenia skuteczności terapii przeciwgruźliczej (Zał. 5: poz. 6, **Publikacja nr 6**).

Arabinogalaktan

Arabinogalaktan *M. tuberculosis* składa się z reszt *D*-arabinofuranozy (α -D-Araf) i *D*-galaktofuranozy (β -D-Galf). Cząsteczki β -D-Galf połączone ze sobą na przemian w pozycji C₅ i C₆ tworzą rdzeń galaktonowy arabinogalaktanu. Do rdzenia galaktonowego dołączone są dwa łańcuchy arabinianowe tworzone przez reszty α -D-Araf połączone ze sobą wiązaniem 1→5 lub dodatkowo w miejscach rozgałęzień 3→5. Do nie redukującego końca łańcucha arabinianowego arabinogalaktanu, na który składa się motyw Ara6, (Araf β (1,2)-Araf α -(1,5)-Araf β (1,2)-Araf α -(1,3)- Araf α -(1,5)-Araf α) przyłączone są cztery cząsteczki kwasów mikołowych¹⁸. Synteza arabinogalaktanu rozpoczyna się w cytoplazmie od utworzenia wspomnianego powyżej odcinka kotwiczącego [\rightarrow Rhap-(1→3)- α -D-GlcNAc-(1→fosfor) w reakcjach katalizowanych przez dwie glikozylotransferazy. W pierwszej kolejności, transferaza *N*-acetyloglukozaminy WecA (Rv1302) katalizuje przeniesienie reszty GlcNAc z UDP-GlcNAc na nośnik lipidowy DP doprowadzając do utworzenia GlcNAc-P-P-DP¹⁹. Następnie w reakcji przeprowadzanej przez transferazę ramnozową (WbbL1, Rv3265c) reszta ramnozy (Rha) jest przeniesiona z dTDP-Rha do GlcNAc-P-P-DP²⁰. Do odcinka kotwiczącego zostają dodane reszty galaktozy w reakcjach katalizowanych przez dwie galaktozylotransferazy. Dwie pierwsze reszty galaktozy są przyłączone do odcinka kotwiczącego w reakcji katalizowanej przez GlfT1 (Rv3782)²¹.

¹⁷ Mikusová K, Mikus M, Besra GS, Hancock I, Brennan PJ. Biosynthesis of the linkage region of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem.* 1996, 271, 7820-8.

¹⁸ Bhamidi S, Scherman MS, Rithner CD, et al. The identification and location of succinyl residues and the characterization of the interior arabinan region allows for a model of the complete primary structure of *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl arabinogalactan. *J Biol Chem.* 2008, 283, 12992–3000.

¹⁹ Jin Y, Xin Y, Zhang W, Ma Y. *Mycobacterium tuberculosis* Rv1302 and *Mycobacterium smegmatis* MSMEG_4947 have WecA function and MSMEG_4947 is required for the growth of *M. smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010, 310, 54–61.

²⁰ Mills JA, Motichka K, Jucker M, et al. Inactivation of the mycobacterial rhamnosyltransferase, which is needed for the formation of the arabinogalactan-peptidoglycan linker, leads to irreversible loss of viability. *J Biol Chem.* 2004, 279:43540–6.

²¹ Mikusova K, Yagi T, Stern R, et al. Biosynthesis of the galactan component of the mycobacterial cell wall. *J Biol Chem.* 2000, 275, 33890–7.

Przyłączenie pozostałych reszt galaktozy katalizuje galaktozylotransferaza GlfT2 (Rv3808c)²². Łańcuchy arabinianowe arabinogalaktanu, syntetyzowane po stronie peryplazmatycznej błony cytoplazmatycznej, powstają w reakcjach katalizowanych przez arabinozylotransferazy używające arabinianu fosfodekaprenolu (DPA) jako donora arabinozy²³. Etambutol, lek przeciwgruźliczy pierwszego rzutu, hamuje syntezę jednostki arabinianowej arabinogalaktanu, jak również lipoarabinomannanu poprzez inhibicję arabinozylotransferaz²⁴. W ostatnich latach zidentyfikowano inhibitory niezbędnej do przeżycia prątków gruźlicy epimerazy DprE1 (Rv3790), biorącej udział w syntezie DPA²⁵. Niektóre z tych inhibitorów zostały zakwalifikowane do dalszych badań i obecnie znajdują się w fazie badań klinicznych. CPZEN-45, hamujący aktywność białka WecA, zabija prątki namnażające się oraz będące w stanie uśpienia. Lek ten znajduje się obecnie w fazie badań przedklinicznych²⁶. W celu identyfikacji inhibitorów syntezy arabinogalaktanu opracowano testy do skriningu bibliotek związków chemicznych. W pracy (Zał. 5: poz. 1, **Publikacja nr 1**) został opisany test do identyfikacji inhibitorów białka WbbL.

Kwasy mikołowe

Jednostka heksaarabinianowa arabinogalaktanu jest estryfikowana przez kwasy mikołowe, które stanowią jeden z podstawowych elementów strukturalnych osłon komórkowych. Nie wszystkie kwasy mikołowe związane są ze szkieletem ściany komórkowej, część z nich występuje w komórce w stanie wolnym jako składniki glikolipidów, najczęściej pochodnych trehaloz. Kwasy mikołowe są długołańcuchowymi, α -alkilo, β -hydroksylowymi kwasami tłuszczowymi składającymi się z dłuższego łańcucha meromikołowego oraz krótszego łańcucha α -alkilowego. W zależności od podstawników występujących w pozycji dystalnej łańcucha meromikołowego wyróżniamy trzy główne typy kwasów mikołowych: α -, keto- i metoksymikołany. Synteza kwasów mikołowych u prątków jest przeprowadzana przez dwa rodzaje syntaz kwasów tłuszczowych: FAS I i FAS II (FAS, fatty acid synthase). FAS I, które jest pojedynczym białkiem posiadającym siedem różnych domen katalitycznych, przeprowadza syntezę krótszych kwasów tłuszczowych o średniej długości (C₁₆-C₂₆). FAS I dostarcza łańcucha α -alkilowego kwasów mikołowych o długości dwudziestu sześciu atomów węgla. FAS II składa się z kilku enzymów o różnych funkcjach, które przeprowadzają syntezę kwasów tłuszczowych o długości do sześćdziesięciu atomów węgla. System FAS II to cykl powtarzających się czterech reakcji: syntezy, redukcji, dehydratacji i redukcji²⁷ (Ryc. 2).

²² Belanova M, Dianiskova P, Brennan PJ, et al. Galactosyl transferases in mycobacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol.* 2008. 190, 1141–5.

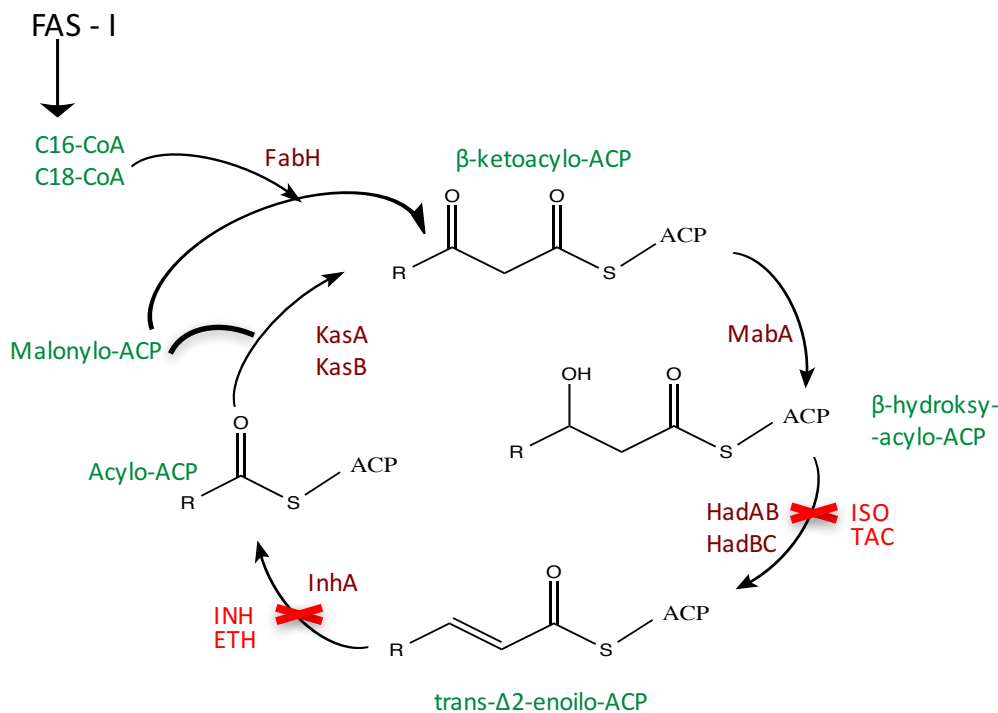
²³ Berg S, Kaur D, Jackson M, Brennan PJ. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* – roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology.* 2007, 17:35R–56R.

²⁴ Goude R, Amin AG, Chatterjee D, Parish T. The arabinosyltransferase EmbC is inhibited by ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009, 53:4138–46.

²⁵ Makarov V, Manina G, Mikusova K, et al. Benzothiazinones kill *Mycobacterium tuberculosis* by blocking arabinan synthesis. *Science.* 2009, 324:801–4.

²⁶ Ishizaki Y, Hayashi C, Inoue K, et al. Inhibition of the first step in synthesis of the mycobacterial cell wall core, catalyzed by the GlcNAc-1-phosphate transferase WecA, by the novel caprazamycin derivative CPZEN-45. *J Biol Chem.* 2013, 288:30309–19.

²⁷ Marrakchi H, Lanéele MA, Daffé M. Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem Biol.* 2014, 21, 67-85.



Rycina 2. Cykl elongacji kwasów mikolowych przeprowadzany przez kompleks syntazy kwasów tłuszczowych II (FAS II) oraz miejsca działania w nim leków przeciwpłatkowych.

Substratami systemu FAS II są malonylo-ACP i acylo-CoA (C₁₆-C₁₈) - produkty systemu FAS I. W wyniku kondensacji Claisena katalizowanej przez syntazę β-ketoacylo-ACP (FabH, Rv0533) powstaje β-ketoacylo-ACP. Reduktaza β-ketoacylo-ACP zależna od NADP (MabA, Rv1483) przeprowadza redukcję β-ketoacylo-ACP doprowadzając do powstania β-hydroksyacylo-ACP, który następnie podlega dehydratacji w reakcji katalizowanej przez dehydratazy β-hydroksyacylo-ACP (HadABC, Rv0635, Rv0636, Rv0637). Białko HadB, posiadające centrum katalityczne, tworzy heterodimer z HadA lub HadC. Heterodimer HadAB jest odpowiedzialny za syntezę krótszych kwasów mikolowych, podczas gdy heterodimer HadBC katalizuje powstanie dłuższych kwasów mikolowych²⁸. Produkt dehydratacji *trans*-Δ²-enoilo-ACP jest redukowany przez reduktazę *trans*-Δ²-enoilo-ACP (InhA, Rv1484) zależną od NADH. Przyłączenie następnej cząsteczki malonylo-CoA do powstałego produktu rozpoczyna kolejny cykl elongacji. Kolejne cykle elongacji są inicjowane przez syntazy β-ketoacylo-ACP (KasA i KasB, Rv2245 i Rv2246). W rezultacie kolejnych cykli FAS II powstaje prekursor łańcucha meromikolanowego, do którego zostają wstawione dwa wiązania podwójne. Mechanizm oraz enzymy odpowiedzialne za powstanie wiązań podwójnych nie są do tej pory poznane. Wiązania podwójne są przekształcane w grupy cyclopropanowe z jednoczesnym wstawieniem grup metylowych. Reakcje te są przeprowadzane przez metylotransferazy zależne od S-adenozylometyoniny. Następnie metylotransferaza MmaA4 (Rv0642c) katalizuje syntezę keto- i metoksymikolanów.

²⁸ Sacco E, Covarrubias AS, O'Hare HM, Carroll P, Eynard N, Jones TA, et al. The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104, 14628-33.

Tak ukształtowany łańcuch meromikolanowy ulega kondensacji z łańcuchem α -alkilowym. Reakcja ta jest katalizowana przez syntazę poliketydową Pks13, posiadającą pięć domen o różnej aktywności niezbędnych do przeprowadzenia reakcji kondensacji²⁷. Gotowe kwasy mikolowe są przenoszone na cząsteczkę trehalozy i w formie monomikolanu trehalozy (TMM) zostają przeniesione do przestrzeni peryplazmatycznej. Badania ostatnich lat doprowadziły do identyfikacji integralnego białka błony cytoplazmatycznej MmpL3 należącego do rodziny transporterów RND (resistance-nodulation and division), przeprowadzającego translokację TMM. Dokładny mechanizm działania MmpL3 ciągle pozostaje niewyjaśniony. Transporter ten może działać jako flipaza przenosząca TMM pomiędzy stroną cytoplazmatyczną a peryplazmatyczną błony cytoplazmatycznej lub też może on przenosić TMM bezpośrednio do przestrzeni peryplazmatycznej (Zař. 5: poz. 2, **Publikacja nr 2**). TMM znajdujące się w przestrzeni peryplazmatycznej jest substratem kompleksu antygeny 85, na który składają się trzy białka (antygen 85a, antygen 85b oraz antygen 85c). Kompleks antygeny 85 katalizuje reakcję transestryfikacji, w której kwasy mikolowe są przenoszone z jednej cząsteczki monomikolanu trehalozy na drugą, w wyniku czego utworzona jest cząsteczka dimikolanu trehalozy (TDM). Ponadto, kompleks antygeny 85 katalizuje przeniesienie kwasów mikolowych z cząsteczki monomikolanu trehalozy na arabinogalaktan²⁹

Kwasy mikolowe są ważne dla funkcji fizjologicznych *M. tuberculosis* i patogenezy gruźlicy, dlatego nie jest zaskakującym, że powszechnie stosowane leki przeciwgruźlicze hamują enzymy zaangażowane w biosyntezę kwasów mikolowych. Do leków tych zalicza się izoniazyd, lek przeciwgruźliczy pierwszego rzutu, stosowany w terapii od ponad 50 lat. Isoniazyd jest prolekiem hamującym aktywność reduktazy *trans*- Δ^2 -enoilo-ACP. Isoniazyd, aktywowany przez bakteryjną katalazę-peroksydazę KatG (Rv1908c), tworzy addukt z dinukleotydem nikotynoamidoadeninowym (NAD). Inhibitorem reduktazy *trans*- Δ^2 -enoilo-ACP jest również lek przeciwgruźliczy drugiego rzutu, etionamid. Aktywacja tego proleku, przeprowadzana przez monooksygenazę EthA (Rv3854c), prowadzi do powstania adduktu pomiędzy etionamidem i NAD. Najczęściej opisanym mechanizmem oporności związanym z izoniazydem i etionamidem są mutacje występujące w aktywatorach tych proleków - KatG i EthA³⁰. Prolekami aktywowanymi przez monooksygenazę EthA są również izoksyl i tioacetazon, leki które były stosowane w antybiotykoterapii gruźlicy w latach 70. i 80-tych w Afryce i Ameryce Łacińskiej. Oba leki posiadają aktywność bakteriobójczą w stosunku do prątków lekowrażliwych oraz wielolekoopornych. Jednakże, ze względu na szereg działań niepořądanych występujących przy ich przyjmowaniu oraz pojawienie się szczepów na nie opornych, zostały wycofane z leczenia. Oba związki hamują biosyntezę kwasów mikolowych. Niedawno scharakteryzowano dokładny mechanizm ich działania. Wykazano, że leki te hamują etap dehydratacji systemu FAS II. Izoksyl i tioacetazon wiążąc się z cysteiną (C61) białka HadA, najprawdopodobniej blokują dostęp substratu do kanału wiążącego jego część acylową, znajdującego się na pograniczu białek HadA i HadB (Zař. 5: poz. 3 i 5, **Publikacja nr 3 i 5**). Innym związkiem hamującym aktywność dehydratazy jest perchlozone. Lek ten został dopuszczony do leczenia gruźlicy wielolekoopornej w Rosji w 2012r. Oporność krzyżowa perchlozonu i tioacetazonu wskazuje na taki sam mechanizm działania obydwu leków. W wyniku zahamowania aktywności dehydratazy i reduktazy zostaje przerwana

²⁹ Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*. 1997, 276, 1420-2.

³⁰ Vilchère C, Jacobs WR Jr. Resistance to Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, Mutations, and Causalities. *Microbiol Spectr*. 2014, 2:MGM2-0014-2013

synteza kwasów mikołowych, a rezultatem jest śmierć komórki bakteryjnej. Leki te działają przede wszystkim na aktywne metabolicznie, namnażające się prątki. Aktywność transportera MmpL3 jest hamowana przez szereg związków różniących się strukturą chemiczną, które jednocześnie skutecznie hamują wzrost *M. tuberculosis*. Należy tutaj wymienić SQ109, NITD-304 i NITD-34, które znajdują się w fazie badań klinicznych. Zaskakującym było, że inhibitory te są również aktywne w stosunku do innych grup bakterii i grzybów nieposiadających kwasów mikołowych. Jednocześnie aktywność tych związków wobec bakterii nieaktywnych metabolicznie wskazywała na inny mechanizm działania niż wyłącznie zahamowanie translokacji TMM. Wykazano, że związki te doprowadzają do zaniku potencjału elektrochemicznego i gradientu protonów, w wyniku czego dochodzi do śmierci komórki bakteryjnej. Zatem związki te działają na enzymy używające siły protonomotorycznej do których zalicza się MmpL3³¹. Udowodniono również, że inhibitory MmpL3 działają synergistycznie z innymi lekami przeciwgruźliczymi, tj. rifampiną, bedaquiline, clofazaminą i β -laktamami³².

Aktywność kompleksu antygeny 85 jest ważna dla utrzymania integralności osłon komórkowych *M. tuberculosis*. Delecja tylko jednego z genów kodujących białka antygeny 85 (*fbpA*, *fbpB*, *fbpC*) doprowadza do redukcji zawartości kwasów mikołowych o 40% i zwiększonej przepuszczalności osłon komórkowych dla cząsteczek hydrofilowych i hydrofobowych. Udowodniono, że mutanty *M. tuberculosis* pozbawione białek antygeny 85 wykazują podwyższoną wrażliwość na leki przeciwgruźlicze pierwszego rzutu oraz wiele innych antybiotyków. TDM syntetyzowany przez antygen 85 pełni ważną rolę w patogenie gruźlicy³³.

Badania nad ebselenem, związkiem aktywnym w stosunku do lekowrażliwych i lekoopornych szczepów *M. tuberculosis* wykazały, że związek ten hamuje aktywność antygeny 85a, b i c. W badaniach nad mechanizmem działania ebselenu stwierdzono, że dochodzi do utworzenia kowalencyjnego wiązania pomiędzy selenem ebselenu i siarką cysteiny antygeny 85 (Zał. 5: poz. 4, **Publikacja nr 4**).

Wzrastająca w szybkim tempie liczba szczepów *M. tuberculosis* opornych na obecnie stosowane antybiotyki wymaga wprowadzenia do leczenia gruźlicy nowych leków o innych mechanizmach działania nie wykazujących oporności krzyżowej z obecnymi terapeutykami. Zahamowanie syntezy osłon komórkowych *M. tuberculosis* jest skuteczną metodą eliminacji prątków namnażających się i aktywnych metabolicznie. Jednak zahamowanie aktywności enzymów biosyntezy osłon komórkowych tj. MmpL3 może również prowadzić do zabicia prątków o niskiej aktywności metabolicznej. Modyfikacje enzymów syntezy osłon komórkowych prowadzą również do zmian strukturalnych i w konsekwencji zmienionej wrażliwości na antybiotyki.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

³¹ Li W, Upadhyay A, Fontes FL, North EJ, Wang Y, Crans DC, Grzegorzewicz AE, et al. Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014, 58, 6413-23.

³² Li W, Sanchez-Hidalgo A, Jones V, de Moura VC, North EJ, Jackson M. Synergistic Interactions of MmpL3 Inhibitors with Antitubercular Compounds in Vitro *Antimicrob Agents Chemother.* 2017, 61: e02399-16

³³ Jackson M, Raynaud C, Lane'elle MA, et al. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the Mycobacterium tuberculosis cell envelope. *Mol Microbiol.* 1999, 31, 1573-87.

Grzegorzewicz A.E., Ma Y., Jones V., Crick D., Liav A., McNeil MR. Development of a microtitre plate-based assay for lipid-linked glycosyltransferase products using the mycobacterial cell wall rhamnosyltransferase WbbL. **Microbiology**, 2008, 154, 3724-30.

W pracy tej podjęto próbę opracowania testu to identyfikacji inhibitorów transferazy ramnozowej WbbL1 (Rv3265c) biorącej udział w tworzeniu odcinka kotwiczącego. Enzym ten jest niezbędny dla przeżycia *M. tuberculosis*, występuje u wszystkich bakterii z rodzaju *Mycobacterium* i jednocześnie jest nieobecny w komórkach eukariotycznych. Z tego względu identyfikacja inhibitorów tego enzymu może przyczynić się do wynalezienia skutecznych leków przeciwgruźliczych. Zaproponowano test, w którym jako źródło enzymu użyto błon cytoplazmatycznych izolowanych z komórek *E.coli* z nadekspresją genu kodującego białko WbbL oraz naturalnego akceptora (GlcNAc-P-P-DP) uzyskanego na drodze syntezy enzymatycznej lub chemicznej. Test ten wykorzystuje różnice między hydrofilowymi właściwościami substratu (dTDP-Rha) i lipofilowymi właściwościami produktu reakcji (Rha-GlcNAc-P-P-DP). W pracy tej przeprowadzono charakterystykę enzymu WbbL i wykazano, że enzym ten do swojej aktywności wymaga kationów dwuwartościowych, jak również jest stymulowany przez β -merkaptoetanol. Określono również optimum pH oraz parametry kinetyczne dla WbbL. Dokonano także analizy kompleksu Rha-GlcNAc-P-P-DP za pomocą spektrometrii masowej.

Na uwagę zasługuję, że opracowany test może być również wykorzystany do zbadania innych transferaz glikozydowych, które katalizują przeniesienie cukrów z ich nukleotydowych donorów do lipidowego akceptora.

Grzegorzewicz A.E., Pham H., Gundi V.A., Scherman M.S., North E.J., Hess T., Jones V., Gruppo V., Born S.E., Korduláková J., Chavadi S.S., Morisseau C., Lenaerts A.J., Lee R.E., McNeil M.R., Jackson M. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. **Nat. Chem. Biol.** 2012,8, 334-41.

Podczas badań przesiewowych (skringingu) zidentyfikowano pochodną mocznika [1-(2-adamantyl)-3-(2,3,4-trifluorofenyl)mocznik (AU1235), która miała działanie bakteriobójcze nie tylko na prątki lekowrażliwe, ale również na prątki wielolekooporne z opornością na rifampicynę, izoniazyd, pyrazynamid, streptomycynę, chinolony i/lub etambutol. Jednocześnie związek ten nie wykazywał aktywności bakteriobójczej w stosunku do innych bakterii Gram-dodatnich lub Gram-ujemnych. Brak oporności krzyżowej z innymi lekami przeciwprątkowymi wskazywał na unikatowy mechanizm działania tego związku. Stosując prekursorzy różnych szlaków metabolicznych znakowane węglem ^{14}C wykazano, że komórki prątka poddane działaniu AU1235 nie wytwarzają dimikolanu trehalozy, akumulują monomikolan trehalozy i charakteryzują się zredukowaną liczbą kwasów mikolowych estryfikujących arabinogalaktan. Wyniki te wskazywały na to, że AU1235 hamuje transport kwasów mikolowych związanych z trehalozą z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. W celu identyfikacji enzymu, na który działa AU1235 wyizolowano mutanty odporne na ten związek, a następnie zsekwencjonowano ich genomy. U wszystkich 17. wyizolowanych mutantów zidentyfikowano mutację w białku, transporterze błony cytoplazmatycznej: MmpL3. Mutacja, znajdująca się w konserwatywnym, błonowym regionie białka, spowodowała zamianę kodonu oznaczającego glicynę na kwas glutaminowy (G253E). W celu potwierdzenia, że mutacja ta faktycznie warunkuje oporność na AU1235 dokonano nadekspresji *mmpL3*, allelu typu dzikiego lub

zmutowanego, zawierającego mutację (G253E) u *M. smegmatis*. Podczas gdy nadekspresja allelu typu dzikiego nie spowodowała wzrostu oporności *M. smegmatis* na AU1235, nadekspresja zmutowanego allelu *mmpL3* przyczyniła się do znaczącego wzrostu oporności tej bakterii na AU1235. Było to szczególnie widoczne, gdy nadekspresji dokonano u *M. smegmatis* z delecją genu kodującego *mmpL3*. Powyższe wyniki potwierdziły, że AU1235 hamuje aktywność MmpL3 oraz wskazywały na to, że MmpL3 przeprowadza transport monomikolanu trehalozy z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. Inną możliwą funkcją MmpL3 byłoby jego działanie jako pompy efluksowej w stosunku do AU1235. Jednakże brak różnicy w akumulacji AU1235 wewnątrz komórek prątków z nadekspresją zmutowanego allelu *mmpL3* w porównaniu do kontroli, posiadającej wyłącznie typ dziki *mmpL3*, wykluczył tę hipotezę. MmpL3 jest enzymem niezbędnym dla przeżycia prątków gruźlicy, gdyż w wyniku zahamowania aktywności MmpL3 zewnętrzna osłona komórkowa nie jest syntetyzowana, czego następstwem jest śmierć komórki bakteryjnej.

Grzegorzewicz A.E., Korduláková J., Jones V., Born S.E., Belardinelli J.M., Vaquié A., Gundi V.A., Madacki J., Slama N., Laval F., Vauboi7urgeix J., Crew R.M., Gicquel B., Daffé M., Morbidoni H.R., Brennan P.J., Quémard A., McNeil M.R., Jackson M. A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. **J. Biol. Chem.** 2012, 287, 38434-41.

W pracy tej podjęto próbę określenia hamującego działania izoksylu i tioacetazonu na *M. tuberculosis*. Przez wiele lat było wiadomo, że leki te hamują syntezę kwasów mikolowych, ale enzym, na który dokładnie działają pozostawał nieznan. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania izoksylu i tioacetazonu zostały zastosowane metody biochemiczne oraz genetyczne. Wyizolowano mutanty *M. tuberculosis* H37Rv i *M. bovis* BCG odporne na izoksyl i tioacetazon, a następnie zsekwencjonowano ich genomy. Zidentyfikowano mutacje w genach kodujących metylotransferazy *mmA2* i *mmA4*. Jednakże nadekspresja tych genów nie zmieniła w sposób istotny oporności prątków gruźlicy na izoksyl i tioacetazon. Ponadto białka kodowane przez *mmA2* i *mmA4* nie są niezbędne dla przeżycia prątków gruźlicy, dlatego zahamowanie ich aktywności nie powinno doprowadzić do śmierci *M. tuberculosis*. Poza szczepami opornymi zawierającymi mutacje w metylotransferazach wyizolowano również mutanty zawierające mutacje w genach *hadA* i *hadC*. Oba geny należą do tego samego operonu, składającego się z trzech genów *hadA*, *hadB* i *hadC* kodujących dehydratazy β -hydroksyacylu. W kolejnym etapie badań dokonano nadekspresji genów z operonu *hadABC*. Nadekspresja całego operonu *hadABC* zwiększyła oporność bakterii na izoksyl, 16 razy i na tioacetazon 80 razy. Jednocześnie nadekspresja innych genów, należących do sytemu FAS II, takich jak *inhA*, *kasA*, *mabA* nie zmieniła wrażliwości bakterii na oba leki. Mutanty *M. bovis* BCG z mutacją w genie *hadA* były odporne na działanie wysokich stężeń obu związków. Wyniki te potwierdziły, że to właśnie enzymy kodowane przez geny *hadABC* są hamowane przez izoksyl i tioacetazon.

Powyższe wyniki, uzyskane metodami biologii molekularnej, zostały również potwierdzone metodami spektrometrii masowej. Aktywnie rosnące bakterie prątków inkubowano z izoksylem lub tioacetazonem, następnie metodami chromatografii gazowo-cieczowej (GC-MS) lub cieczowej (LC-MS) sprzężonej ze spektrometrią masową dokonano analizy kwasów tłuszczowych, która wykazała akumulację kwasów 3-hydroksy C₁₈-C₂₂ wskazując na zahamowanie etapu dehydratacji w systemie FAS II.

Podsumowując, w pracy tej na podstawie dowodów genetycznych i biochemicznych wykazano, że izoksyl i tioacetazon hamują etap dehydratacji systemu FAS II. Zahamowanie enzymów systemu FAS II jest skutecznym sposobem zabicia prątków gruźlicy. Przykładem skutecznego leku przeciwgruźliczego, hamującego syntezę kwasów mikołowych jest izoniazyd hamujący InhA. Izoksyl, tioacetazon oraz perchlozone są pierwszymi znanymi związkami będącymi inhibitorami dehydrataz β -hydroksyacylu. Nie wykazują oporności krzyżowej z izoniazydem, jak również aktywowane są przez inny enzym. Opracowanie inhibitorów dehydrataz w przyszłości może dostarczyć nowych leków przeciwgruźliczych o skuteczności porównywalnej do izoniazylu.

Favrot L., **Grzegorzewicz A.E.**, Lajiness D.H., Marvin R.K., Boucau J., Isailovic D., Jackson M., Ronning D.R. Mechanism of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85 by ebselen. **Nat. Commun.** 2013, 4, 2748.

Wśród białek wydzielniczych *M. tuberculosis* naczelnie miejsce zajmuje kompleks antygeny 85 na który składają się trzy białka (antygen 85a, antygen 85b oraz antygen 85c). W pracy tej opisano identyfikację oraz mechanizm działania, *in vitro* i *in vivo*, inhibitora kompleksu antygeny 85 - ebselenu. Podczas badań przesiewowych z zastosowaniem testu fluorescencyjnego zidentyfikowano ebselen jako inhibitor antygeny 85c. Ebselen wykazuje aktywność bakteriobójczą w stosunku do prątków lekowrażliwych i lekoopornych.

Ebselen jest aromatyczną cząsteczką z atomem selenu uwięzionym w jednym z pierścieni. Badania z użyciem monomikolanu trehalozy i trehalozy znakowanej ^{14}C nie tylko potwierdziły hamujące działanie ebselenu na antygen 85c, ale dodatkowo wykazały, że związek ten jest także inhibitorem antygeny 85a i b. W celu identyfikacji działania ebselenu na kompleks antygeny 85 *in vitro* zastosowano metodę znakowania węglem ^{14}C i dowiedziono, że ebselen doprowadza do zahamowania syntezy dimikolanu trehalozy oraz kompleksu arabinogalaktan-kwasy mikołowe (mAG), a jednocześnie nie ma wpływu na syntezę monomikolanu trehalozy. Ebselen jest znany jako związek reagujący z tiolami, gdyż selen zawarty w cząsteczce ebselenu tworzy stabilne wiązanie z siarką grupy tiolowej. Dlatego zaproponowaliśmy hipotezę, że ebselen reaguje z cysteiną antygeny 85c. Antygen 85c posiada tylko jedną cysteinę (C209). Cysteina 209 nie wchodzi jednak w skład centrum aktywnego antygeny 85c i jest zlokalizowana na C końcu położonej centralnie β -harmonijki. Analiza za pomocą spektrometrii masowej antygeny 85c inkubowanego z ebselenem wykazała wzrost masy równy jednej cząsteczce ebselenu (274.18 Da) potwierdzając kowalencyjne wiązanie ebselenu do cząsteczki cysteiny. Udowodniono również kowalencyjne wiązanie ebselenu do cysteiny (C211) antygeny 85a i b. Następnie wykazano, że modyfikacja antygeny 85c przez ebselen doprowadza do utraty przez to białko aktywności enzymatycznej. Podobny efekt zaobserwowano, gdy cysteinę 209 zamieniono na inny aminokwas. Wyniki te wskazywały na ważną rolę cysteiny 209 w aktywności enzymatycznej antygeny 85c. Spektroskopia rentgenowska antygeny 85c inkubowanego z ebselenem wykazała, że związek ten zmienia strukturę centrum aktywnego antygeny 85c, poprzez modyfikację sieci wiązań wodorowych występujących między triadą katalityczną antygeny 85c, cysteiną 209 i alfa helisą dziewiątą.

Podsumowując, w pracy tej opisano mechanizm inhibicji antygeny 85 c przez ebselen, który wykazuje właściwości bakteriobójcze w stosunku do prątków lekowrażliwych oraz wielolekoopornych. Uzyskane wyniki udowodniły, że modyfikacja cysteiny antygeny 85 jest skutecznym sposobem zahamowania

aktywności tego enzymu, jednocześnie z uwagi na istotną rolę tego aminokwasu dla aktywności antygenu 85 nie powinno dochodzić do jej mutacji w bakteriach.

Grzegorzewicz A.E, Eynard N., Quémard A., North E.J., Margolis A., Lindenberger J.J., Jones V., Korduláková J., Brennan P.J., Lee R.E., Ronning D.R., McNeil M.R., Jackson M. Covalent modification of the *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratase by isoxyl and thioacetazone. **ACS Infect. Dis.** 2015, 1, 91-97.

Praca ta jest kontynuacją badań nad mechanizmem działania izoksylu i tioacetazonu na komórki prątków gruźlicy. W pracy (Grzegorzewicz *et al.*, 2012) wykazano, że związki te działają na dehydratazy β -hydroksyacylu, jednak wciąż pozostawało do określenia w jaki dokładnie sposób izoksyl i tioacetazon hamują ten etap syntezy kwasów mikołowych. Najczęściej pojawiającą się mutacją u szczepów opornych na oba leki, była niesynonimiczna mutacja punktowa w genie *hadA*, zmieniająca cysteinę na serynę (C61S). Wysunięto hipotezę, że grupa tiomocznikowa izoksylu i tioacetazonu wiąże się kowalencyjnie z cysteiną białka HadA. Próby udowodnienia tej hipotezy w systemie *in vitro*, w którym inkubowano oczyszczone białko HadA z badanymi związkami nie powiodły się, prawdopodobnie ze względu na brak prawidłowej aktywacji leków, do której wymagana jest obecność wspomnianej wcześniej monooksygenazy EthA. Skonstruowano szczep rekombinacyjny *M. bovis* BCG z nadekspresją białka HadA i poddano go działaniu izoksylu lub tioacetazonu, a następnie wyizolowano i oczyszczono białko HadA i poddano je analizie metodami spektrometrii masowej. Przewagą systemu, w którym jako gospodarza użyto *M. bovis* BCG była obecność u tej bakterii monooksygenazy EthA, aktywatora obu związków. Zaobserwowano, że białko HadA inkubowane z izoksylem lub tioacetazonem jest mniejsze o dwie jednostki masy od białka w próbie kontrolnej. Ponadto masa atomowa HadA uległa zwiększeniu o 2 jednostki masy po potraktowaniu środkiem redukującym. Wyniki te wskazywały na powstanie mostka dwusiarczkowego pomiędzy dwiema cysteinami obecnymi w białku HadA. Analiza peptydów uzyskanych po trawieniu białka HadA trypsyną wykazała obecność dwupeptydu połączonego mostkiem dwusiarczkowym utworzonym pomiędzy cysteinami C61 i C105 białka HadA. Na tym etapie badań nie udało się jednak wyizolować kompleksów enzym-inhibitor, prawdopodobnie ze względu na ich niestabilność spowodowanych obecnością drugiej cysteiny (C105) w białku HadA. W celu stabilizacji kompleksów enzym-inhibitor przygotowano białko rekombinowane HadA, w którym zamieniono cysteinę (C105) na alaninę. *M. bovis* BCG z nadekspresją zmutowanego genu *hadA* zostało poddane działaniu tioacetazonu, a następnie, podobnie jak w poprzednich eksperymentach, oczyszczone białko HadA zostało zanalizowane metodami spektrometrii masowej. Masa zmutowanego białka HadA izolowanego z komórek prątków inkubowanych z tioacetazonem zwiększyła się o 234 jednostki masy, wskazując na wiązanie sulfenowej formy tioacetazonu do białka HadA. Przygotowano rekombinacyjny szczep *E. coli*, w którym, oprócz nadekspresji zmutowanego genu *hadA*, dokonano również nadekspresji aktywatora izoksylu i tioacetazonu genu *ethA*. Analiza zmutowanego białka HadA izolowanego z komórek *E. coli* poddanych działaniu izoksylu wykazała wzrost masy cząsteczkowej białka HadA o 394 jednostki masy. Podobnie, jak w przypadku tioacetazonu aktywną formą izoksylu wiążącą się do białka HadA jest jego forma sulfenowa.

Wiązanie izoksylu lub tioacetazonu do cysteiny 61 białka HadA, najprawdopodobniej blokuje dostęp substratu do kanału wiążącego jego część acylową, znajdującego się na pograniczu białek HadA i HadB. W

wyniku zahamowania aktywności dehydrataz zostaje przerwana synteza kwasów mikolowych czego rezultatem jest śmierć komórki bakteryjnej. Badania te również dostarczyły informacji na temat aktywnej formy izoksylu i tioacetazonu, która jest pochodną sulfenową obu związków.

Jednym z podstawowych problemów przy stosowaniu izoksylu i tioacetazonu było powstawanie szczepów opornych z mutacją w genie *ethA* odpowiedzialnym za aktywację obu proleków. Dzięki poznaniu aktywnej formy tych związków można zaprojektować leki, które nie wymagałyby etapu aktywacji, omijając w ten sposób możliwość powstania szczepów opornych. Powyżej opisane odkrycia powinny pomóc w syntezie nowych inhibitorów etapu dehydratacji.

Grzegorzewicz A.E., de Sousa-d'Auria C., McNeil M.R., Huc-Claustre E., Jones V., Petit C., Angala S.K., Zemanová J., Wang Q., Belardinelli J.M., Gao Q., Ishizaki Y., Mikušová K., Brennan P.J., Ronning D.R., Chami M., Houssin C., Jackson M. Assembling of the *Mycobacterium tuberculosis* Cell Wall Core. **J. Biol. Chem.** 2016, 291, 8867-79.

W ostatnich latach scharakteryzowano u bakterii Gram-dodatnich enzymy odpowiedzialne za transfer polimerów ściany komórkowej, tj. kwasów tejchojowych, z ich lipidowego nośnika do peptydoglikanu. Enzymy te należą do rodziny białek LytR-Cps2A-Psr (LCP). Biorąc pod uwagę podobieństwo pomiędzy odcinkiem kotwiczącym kwasów tejchojowych i arabinogalaktanu, wysunęliśmy hipotezę, że reakcja ligacji peptydoglikanu i arabinogalaktanu może być również katalizowana przez enzymy z rodziny LCP. Enzym ten powinien katalizować reakcję hydrolizy pirofosforanu w pirofosforanie dekaprenylu należącym do odcinka kotwiczącego oraz przeniesienia arabinogalaktanu lub jego prekursora do kwasu muraminowego peptydoglikanu.

Białka LCP posiadają konserwatywną drugorzędową strukturę, charakteryzującą się obecnością N-końcowej domeny cytoplazmatycznej, od jednej do trzech domen transbłonowych i peryplazmatycznego regionu zawierającego domenę katalityczną LytR-Cps2A-Psr. Opierając się na tych kryteriach dokonaliśmy analizy genomu *M. tuberculosis* w celu identyfikacji białek LCP. Wyniki analizy ujawniły obecność trzech białek (Rv3267, Rv3484 i Rv0822c) posiadających motyw LCP i charakterystyczną dla białek LCP strukturę drugorzędową. Analiza eksperymentalna topologii białek Rv3267(CpsA1), Rv3484 (CpsA2) i Rv0822c potwierdziła lokalizację ich C-końca zawierającego domenę katalityczną LCP w peryplazmie. Rekombinowane białka Rv3267, Rv3484 i Rv0822c przetestowano na aktywność pirofosfatazy w teście z użyciem pirofosforanu geranylu. Wszystkie trzy białka wykazały zdolność do uwolnienia fosforu z grupy pirofosforanowej. Aktywność ta była zależna od jonów Mg^{2+} . W kolejnym etapie badań podjęto próbę delecji genów kodujących Rv3267, Rv3484 i Rv0822c. Indywidualna delecja genów kodujących białek LCP, jak również połączona delecja *Rv3267 i Rv0822c* nie była istotna dla przeżycia prątków gruźlicy. Nie udało się uzyskać mutantów z podwójną delecją genów *Rv3267 i Rv3484*. Wyniki te wskazywały na to, że Rv3267 i Rv3484 posiadają aktywność komplementarną i są niezbędne dla przeżycia tych bakterii. Podczas gdy delecja *Rv3484 lub Rv0822c* nie przyczyniła się do istotnych zmian w szybkości wzrostu mutantów, istotne zmiany zaobserwowano dla szczepu z delecją *Rv3267*, który nie tylko charakteryzował się wolniejszym wzrostem i modyfikacją cech morfologicznych, ale również wykazywał zwiększoną wrażliwość na szereg antybiotyków. Analiza zawartości odcinka kotwiczącego u szczepów z delecją białek LCP nie wykazała istotnych zmian, prawdopodobnie ze względu na komplementarną aktywność tych białek.

U blisko spokrewnionych bakterii *Corynebacterium glutamicum* zidentyfikowano dwa białka należące do rodziny LCP, Cg0847 i Cg3210. Cg0847 jest ortologiem Rv3267 i jego delecja jest letalna dla *C. glutamicum*. Cg0847 przypomina Rv0822c i nie jest istotny dla przeżycia *C. glutamicum*. Przygotowano rekombinacyjny szczep *C. glutamicum*, w którym ekspresja genu Cg0847 była zależna od obecności tiogalaktozydu izopropylu. Bakterie *C. glutamicum* z obniżoną ekspresją Cg0847 charakteryzowały się wolniejszym wzrostem oraz odmienną morfologią. Za pomocą cryo-TMM zaobserwowano zmiany w wygładzie błony zewnętrznej, która nie stanowiła jednolitej, ciągłej warstwy tak jak u typu dzikiego *C. glutamicum*. Ponadto wykazano, że obniżona ekspresja Cg0847 prowadzi do wydzielania przez *C. glutamicum* materiału zewnątrzkomórkowego składającego się przede wszystkim z fragmentów błony zewnętrznej i peptydoglikanu. Jednocześnie analiza odcinka kotwiczącego w warunkach obniżonej ekspresji Cg0847 wykazała obniżoną ilość arabinogalaktanu przyłączonego do peptydoglikanu. Uzyskane wyniki wskazywały na to, że to Rv3267 i Rv3484 pełnią funkcję ligaz odpowiedzialnych za połączenie peptydoglikanu i arabinogalaktanu u *M. tuberculosis*. Rv0822c, najprawdopodobniej pełni odmienną funkcję, gdyż było możliwe uzyskanie podwójnego mutantu z równoczesną delecją Rv0822c i Rv3267. Funkcję ligazy u *C. glutamicum* pełni jeden enzym Cg0847.

ZA NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘTE REZULTATY UWAŻAM:

1. Odkrycie i scharakteryzowanie białka MmpL3 odpowiedzialnego za translokację kwasów mikolowych z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej.
2. Odkrycie i scharakteryzowanie enzymów odpowiedzialnych za ligację arabinogalaktanu i peptydoglikanu u *Mycobacterium tuberculosis* i *Corynebacterium glutamicum*.
3. Określenie molekularnego mechanizmu działania izoksylu i tioacetazonu na syntezę kwasów mikolowych *M. tuberculosis* poprzez zahamowanie etapu dehydratacji FAS II.
4. Wyjaśnienie mechanizmów oporności *M. tuberculosis* na izoksyl i tioacetazone.
5. Określenie molekularnego mechanizmu działania ebselenu na kompleks antygeny 85 *M. tuberculosis*.
6. Opracowanie testu do skringu inhibitorów transferazy ramnozowej WbbL oraz innych transferaz glikozydowych.

Wyniki zaprezentowane w wyżej opisanych pracach mogą przyczynić się do zaprojektowania leków przeciwgruźliczych o nowych mechanizmach działania, niewykazujących krzyżowej oporności z obecnie stosowanymi terapeutykami. Szczególnie atrakcyjnym wydaje się opracowanie leków opartych na zahamowaniu aktywności białka MmpL3, jak również białek pełniących funkcję ligaz - CpsA1 and CpsA2. Biorąc pod uwagę udowodnioną już skuteczność izoksylu i tioacetazonu w terapii gruźlicy, dogłębne poznanie mechanizmu działania tych antybiotyków pozwoli na zaprojektowanie leków o podobnej skuteczności, ale z lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Podsumowanie

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 25 artykułach oryginalnych i przeglądowych: 20 pracach oryginalnych opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, w tym (pierwszy autor – 5 prac, w tym jednej pracy równorzędnie z pierwszym autorem), współautorstwo w 5 pracach spoza bazy JCR, w tym 4 artykułach przeglądowych i jednym rozdziale do książki, 28 komunikatach zjazdowych oraz 2 referatach wygłoszonych na międzynarodowych i krajowych konferencjach. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) wszystkich prac wynosi 80,01, a suma punktów MNiSW: 571,5. Do dnia 4 maja 2018r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 558 razy, w tym 539 razy wyłączając autocytaowania. Łączny IF sześciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 40,195, przy ilości cytowań 265.

Ponadto w ramach działalności naukowej uczestniczyłam w czterech projektach badawczych finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (w tym w jednym byłam kierownikiem). Ponadto byłam wykonawcą w czterech projektach finansowanych przez amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (NIH) i Narodowy Instytut Alergii i Chorób Zakaźnych (NIAID). Brałam udział w jednym projekcie uczelnianym (Uniwersytet Stanowy Kolorado) oraz jednym projekcie finansowanym przez Instytut Kolorado Nauk Klinicznych i Translacyjnych (CCTSI).

A) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

Powierzchniowe składniki osłon komórkowych aktynobakterii

Pracę magisterską zatytułowaną „Poszukiwanie aktywności fosfolipazy A2 w macierzy jądrowej i jej białkowych składnikach” wykonałam pod opieką prof. dr hab. Arkadiusza Kozubka w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego. W roku 1997 rozpoczęłam pracę w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu na stanowisku asystenta technicznego. Dołączyłam do Laboratorium Aktynomikologii kierowanego przez prof. dr hab. Halinę Mordarską, która zajmowała się problemami zakażeń wywołanych przez promieniowce. W ramach grantu dla młodego pracownika (Zał. 3: VII, **proj. 1**), podjęłam badania nad lokalizacją glikolipidów głównych *Propionibacterium propanicum* w osłonach komórkowych. Wyniki badań zostały zaprezentowane w postaci doniesienia konferencyjnego (Zał. 3: X.1. **konf. 4**) oraz stały się inspiracją tematu mojej pracy doktorskiej zatytułowanej „Powierzchniowe składniki osłon komórkowych aktynobakterii”. Podjęty temat był istotny ze względu na poznanie struktur drobnoustrojów biorących udział w mechanizmach patogenez. Celem pracy była charakterystyka osłon komórkowych wybranych szczepów promieniowców obejmująca analizę ultrastruktury, właściwości fizyko-chemicznych i składu chemicznego, ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji glikolipidów głównych tych bakterii. Do badań wybrano szczepy promieniowców z grup wykazujących różnice w budowie i składzie osłon komórkowych, czyli *Propionibacterium propanicum*, *Saccharopolyspora hirsuta*, *Nocardiosis dassonvillei*, *Gordonia bronchialis* i *Rhodococcus equi*. Nie bez znaczenia był fakt, że struktury glikolipidów głównych tych bakterii zostały wcześniej ustalone w Laboratorium Aktynomikologii. W pracy dokonano analizy lokalizacji

rozmieszczenia glikolipidów głównych w osłonach komórkowych stosując metody biochemiczne, jak również opracowano metodę immunochemiczną. Obie metody potwierdziły lokalizację glikolipidów głównych *Propionibacterium propionicum*, *Saccharopolyspora hirsuta* oraz *Nocardiopsis dassonvillei*, przede wszystkim w błonie cytoplazmatycznej oraz *Rhodococcus equi* i *Gordonia bronchialis* na powierzchni komórki. Stosując różne metody mikroskopowe dokonano również analizy struktur osłon komórkowych. Badania były realizowane w ramach grantu promotorskiego (Zał. 3: VII, **proj. 2**) oraz zostały zaprezentowane w formie doniesień zjazdowych (Zał. 3: X.1 **konf. 7,10,11**; X.2 **konf. 1,7**). Podczas wykonywania mojej pracy doktorskiej odbyłam staż naukowy w Centrum Chemicznym Uniwersytetu Lund w Szwecji, w laboratorium kierowanym przez prof. Bengta Danielssona. Dzięki tej współpracy miałam możliwość zapoznania się z techniką mikroskopii sił atomowych, która została zastosowana do analizy osłon komórkowych promieniowców. Opis techniki mikroskopii sił atomowych wraz z przykładami jej zastosowania do analizy osłon komórkowych aktynobakterii został zawarty w pracy przeglądowej (Zał. 3: I.1.2. **Art. 4**).

Równolegle do badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej uczestniczyłam w pracach Laboratorium Aktynomikologii, które w późniejszym czasie weszło w strukturę Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, kierowanego przez prof. dr. hab. Andrzeja Gamiana.

Poniżej przedstawiono najważniejsze osiągnięcia wynikające z realizacji tych badań:

Identyfikacja i analiza strukturalna glikolipidów głównych

Propionibacterium propionicum występuje w jamie ustnej człowieka i jest czynnikiem etiologicznym zakażeń przypominających typową promienicę. W osłonach komórkowych *Propionibacterium propionicum* zostały wykryte glikolipidy główne, które okazały się użytecznym narzędziem diagnostycznym. Mój udział w tym projekcie polegał na izolacji i oczyszczaniu glikolipidów głównych z komórek *Propionibacterium propionicum* (Zał. 3: X.1. **konf. 1**).

Bakterie z rodzaju *Rothia* zaliczane są do bakterii oportunistycznych mogą wywoływać zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie płuc i posocznice. Brałam udział w ustaleniu struktury glikolipidu głównego *Rothia dentocariosa* oraz badaniu właściwości biologicznych glikolipidu głównego *Rothia mucilaginoso*. Glikolipid główny *Rothia dentocariosa* okazał się dimmanozyloglicerydem. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w formie publikacji (Zał. 3: I.1.1. **Art. 1** oraz Zał. 3: I.2.1. **Art. 1**).

W latach 2000-2003 brałam udział w projekcie dotyczącym gliko- i fosfolipidów prątko- i nokardiopodobnych aktynobakterii należących do rodzajów *Gordonia*, *Tsukamurella* i *Oerskovia* (Zał. 3: VII, **proj. 3**), które wywołują gruźliczopodobne zakażenia oportunistyczne (Zał. 3: X.1. **konf. 6,8** oraz Zał. 3: X.2. **konf. 4,6**). Brałam również udział w badaniach dotyczących kwasów nokardiomikolowych (Zał. 3: VII, **proj. 4** oraz Zał. 3: X.2. **konf. 5**).

Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* występujące w układzie pokarmowym człowieka mają właściwości probiotyczne. W ramach współpracy z dr Galiną Novik z Białoruskiej Kolekcji Mikroorganizmów w Mińsku brałam udział w identyfikacji i analizie glikolipidów i fosfolipidów *Bifidobacterium* (Zał. 3: I.2.1. **Art. 2,3** i Zał. 3: X.2. **konf. 2,3**).

Badania epidemiologiczne nokardioz i chorób promieniczopodobnych

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN w 2000 roku włączyło się do europejskiego programu epidemiologicznego badania nocardioz i chorób wywoływanych przez aktynobakterie. W ramach popularyzacji tego tematu byłam współautorem prac przeglądowych (Załącznik 3: I.1.2. **Art. 1,2,3**). W tym okresie uczestniczyłam w identyfikacji przysyłanych izolatów z wykorzystaniem metod chemicznych. W formie doniesień konferencyjnych zostały zaprezentowana identyfikacja *Actinomyces* sp. z przypadku infekcji aktynomikotycznej (Załącznik 3: X.1. **konf. 2,3,5**), jak również identyfikacja szczepu zawierającego kwasy mikołowe wyizolowanego z zakażenia rany po zabiegu kardiochirurgicznym (Załącznik 3: X.1. **konf. 9,12**).

A) PRZEBIEG PRACY NAUKOWEJ PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii otrzymałam w 2003 roku. Od 2004 do 2008 roku odbywałam staż podoktorski na Uniwersytecie Stanowym w Kolorado (Colorado State University) w laboratorium kierowanym przez prof. Michela McNeila. W roku 2008 zostałam zatrudniona w laboratorium Mary Jackson, -początkowo w ramach stażu podoktorskiego, a od roku 2011 na stanowisku asystenta (research scientist). Poniżej przedstawiono najważniejsze osiągnięcia naukowe tego okresu.

Opracowanie i zastosowanie testów do skringu inhibitorów hamujących syntezę osłon komórkowych *M. tuberculosis*

Mój staż naukowy w laboratorium prof. Michela McNeila rozpoczęłam od opracowania testu do skringu inhibitorów transferazy ramnozowej WbbL (Załącznik 3: VII, **proj. 5**). Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji wchodzącej w skład cyklu habilitacyjnego, jak również były prezentowane w formie doniesień konferencyjnych (Załącznik 3: X.2. **konf. 9,10**). Brałam również udział w opracowaniu testu do skringu inhibitorów RmlC, enzymu biorącego udział w biosyntezie dTDP-Rha (Załącznik 3: VII, **proj. 6**). Badania te były prowadzone we współpracy z Instytutem Medycyny i Inżynierii Uniwersytetu Pensylwanii. Wynikiem tych badań była identyfikacja inhibitorów RmlC, która została opisana w publikacji (Załącznik 3: I.2.1. **Art. 6**).

Charakterystyka działania bakteriofagowego białka LysB na osłony komórkowe *M. smegmatis*

Kaseta lityczna bakteriofaga Ms6 infekującego *Mycobacterium smegmatis* składa się z pięciu genów. Oprócz holiny i endolizyny, Ms6 koduje również białko LysB, które jest lipazą hydrolizującą wiązanie estrowe lipidów i estrów. We współpracy z Uniwersytetem Lizbońskim podjęliśmy badania nad funkcją białka LysB w bakteriolizie *M. smegmatis*. Wykazano, że białko LysB działa na błonę zewnętrzną mikobakterii poprzez hydrolizę wiązania estrowego pomiędzy kwasami mikołowymi i arabinogalaktanem oraz pomiędzy kwasami mikołowymi i trehalozą w dimikolanie trehalozy. Wyniki tych badań zostały przedstawione w formie publikacji i doniesienia konferencyjnego (Załącznik 3: I.2.1. **Art. 7** oraz Załącznik 3: X.2. **konf. 11**).

Charakterystyka enzymów *M. tuberculosis* katalizujących syntezę osłon komórkowych

Identyfikacja białka Mmpl3 odpowiedzialnego za translokację kwasów mikołowych z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej oraz ligaz odpowiedzialnych za połączenie arabinogalaktanu i peptydoglikanu (Zał. 3: VII, **proj. 8,10**) została opisana w publikacjach stanowiących cykl habilitacyjny, ponadto wyniki były prezentowane w formie doniesienia konferencyjnego (Zał. 3: X.2. **konf. 12**) oraz publikacji (Zał. 3: I.2.1. **Art. 14**).

W ramach współpracy z Uniwersytetem Birmingham brałam udział w identyfikacji transferazy ramnozowej *Corynebacterium glutamicum* NCgl0543 katalizującej dodanie końcowej ramnozy do rdzenia arabinianowego (Zał. 3: I.2.1. **Art. 5**).

We współpracy z Papieskim Uniwersytetem Katolickim z Rio Grande ustaliliśmy, że fosforybozylotransferaza uracylowa, kodowana przez *upp* (*Rv3309c*), katalizująca utworzenie urydyno-5'-monofosforanu (UMP) nie jest istotna dla przeżycia *M. tuberculosis* (Zał. 3: I.2.1. **Art. 18**).

Hydrolazy epoksydowe *Mycobacterium tuberculosis*

Analiza genomu *Mycobacterium tuberculosis* wykazała obecność sześciu domniemych hydrolaz epoksydowych (EphA-EphF), prawdopodobnie zaangażowanych w metabolizm kwasów tłuszczowych. W celu określenia funkcji tych enzymów dokonaliśmy delecji poszczególnych genów kodujących hydrolazy epoksydowe. Żadna z hydrolaz epoksydowych nie była niezbędna *Mycobacterium tuberculosis* do przeżycia. Jednak mutanty pozbawione genu *ephD*, wykazały zmiany w profilu kwasów mikołowych. Badania nad funkcją hydrolazy epoksydowej D (EphD) zostały podjęte we współpracy z dr Janą Kordulakovą z Uniwersytetu Komeńskiego w Bratysławie. Wykazano, że EphD jest zaangażowana w syntezę ketomikolanów. Wyniki tych badań zostały zawarte w publikacji (Zał. 3: I.2.1. **Art. 19**). Prowadziliśmy również badania nad funkcją hydrolazy epoksydowej E (EphE) (Zał. 3: X.2. **kon. 15**).

Określenie mechanizmu działania związków wykazujących hamujące działanie na wzrost *M. tuberculosis*

Oprócz badań nad mechanizmem działania izoksylu, tioacetazonu (Zał. 3: VII, **proj. 7,9,11**) i ebselenu, których wyniki zostały zawarte w publikacjach stanowiących cykl habilitacyjny oraz zaprezentowane w formie doniesień konferencyjnych (Zał. 3: X.2. **konf. 13,14,16**) prowadziłam badania nad 2-aminotiofenem inhibitorem Pks13. Badania te były prowadzone we współpracy z Uniwersytetem Toledo. Mój udział polegał na określeniu działania 2-aminotiofenem na aktywnie rosnące komórki *M. tuberculosis*. Wykazałam, że 2-aminotiofen hamuje syntezę wszystkich klas kwasów mikołowych (Zał. 3: I.2.1. **Art. 16**).

Pochodna mocznika (AU1235) zidentyfikowana pierwotnie jako inhibitor Mmpl3 okazała się również inhibitorem hydrolaz epoksydowych *M. tuberculosis*. Opierając się na tym odkryciu, zsyntetyzowano związki o podobnej strukturze, ale odznaczające się lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi. Opracowane inhibitory zostały przetestowane pod względem ich zdolności do hamowania EphA i EphB, jak również aktywnie rosnących prątków gruźlicy. Badania te były prowadzone we współpracy z Badawczym Szpitalem Dziecięcym im Św. Juda i zostały zaprezentowane w formie publikacji (Zał. 3: I.2.1. **Art. 8,10,12**).

13.05.2018

Anna Grzegorzewicz

Dr Anna Grzegorzewicz