

Bożena Czubat

Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Instytut Biologii i Biotechnologii

Dziedzina: nauki ścisłe i przyrodnicze  
Dyscyplina: biologia

## Synteza witaminy B<sub>12</sub> u mykobakterii

### STRESZCZENIE

Gruźlica jest chorobą zakaźną wywoływaną przez prątki *Mycobacterium tuberculosis*. Każdego roku ok. 1,5 mln ludzi umiera z jej powodu. Skuteczna kontrola gruźlicy jest uznawana za jeden z głównych celów współczesnej medycyny. Ze względu na rosnącą lekooporność bakterii jest to jednak choroba trudna w leczeniu. Jedną z potencjalnych tarcz molekularnych dla nowych leków przeciwprątkowych jest RNaza klasy I, kodowana przez gen *rv2228c* *M. tuberculosis*. Homologiem Rv2228c u modelowego szczepu *Mycobacterium smegmatis* jest białko MSMEG4305. Składa się ono z N-terminalnej domeny homologicznej z eukariotyczną i prokariotyczną RNazą H, a także z C-terminalnej domeny z aktywnością kwaśnej fosfatazy o potencjalnej roli w syntezie witaminy B<sub>12</sub>. Metabolizm witaminy B<sub>12</sub> u *M. tuberculosis* wciąż pozostaje niewyjaśnionym problemem. Witamina B<sub>12</sub> znana również jako kobalamina jest rozpuszczalną w wodzie strukturalnie złożoną cząsteczką, która, jak się uważa, wpływa na metabolizm *M. tuberculosis* poprzez dwa mechanizmy:

- i) pełnienie roli kofaktora dla trzech enzymów: syntazy metioniny, mutazy metylomalonylo-CoA oraz reduktazy rybonukleotydów,
- ii) regulację ekspresji genów przez przyłączanie się do ryboprzełączników w mRNA.

Celem pracy było określenie znaczenia witaminy B<sub>12</sub> dla komórek mykobakterii. Cel ten zrealizowano poprzez:

- ocenę możliwości syntezy witaminy B<sub>12</sub> przez *M. tuberculosis*,
- określenie znaczenia domeny CobC dla funkcjonowania białka MSMEG4305 w komórkach *M. smegmatis*,
- analizę fenotypową mutantu *M. smegmatis*, u którego upośledzony jest szlak syntezy witaminy B<sub>12</sub>,
- identyfikację czynników środowiskowych wpływających na syntezę witaminy B<sub>12</sub>.

Ocenę możliwości syntezy witaminy B<sub>12</sub> przez *M. tuberculosis* wykonano poprzez ocenę poziomu substytucji synonimicznych i niesynonimicznych w genach zaangażowanych w metabolizm tej witaminy w populacji 3798 szczepów klinicznych. Wykazano, że geny związane z biosyntezą i transportem witaminy B<sub>12</sub> oraz kodujące enzymy wymagające do swojej aktywności kobalaminy znajdują się pod wpływem doboru oczyszczającego. Uzyskane wyniki sugerują, że obecność genów szlaku syntezy witaminy B<sub>12</sub> jest adaptatywna dla funkcjonowania komórki bakteryjnej. Co więcej, obecność doboru oczyszczającego, działającego na szlak syntezy witaminy B<sub>12</sub> w komórkach *M. tuberculosis*, sugeruje, że szlak ten jest funkcjonalny.

W kolejnym etapie prac badano udział białka MSMEG4305 w syntezie kobalaminy u *M. smegmatis*. Wzrost mutantu *M. smegmatis* pozbawionego genu *msmeg4305* analizowano na podłożu z propionianem oraz kontrolnie na podłożu z glukozą, jako jedynymi źródłami węgla. Ponadto w szczepie mutancie  $\Delta$ *msmeg4305* dodatkowo inaktywowano gen *prpR* kodujący białko regulujące ekspresję enzymów zaangażowanych w degradację propionianu. Delecja genu *prpR* wymusza w komórce uruchomienie alternatywnego szlaku metabolizującego propionian – szlaku metylomalonylo-CoA, którego główny enzym – MCM - wymaga do swojej aktywności kobalaminy. Przygotowano także mutantu *M. smegmatis*  $\Delta$ *cobIJ* pozbawionego zdolności do syntezy enzymów o potwierdzonym udziale w procesie biosyntezy witaminy B<sub>12</sub> u mykobakterii. Zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu mutantu  $\Delta$ *cobIJ*/ $\Delta$ *prpR* na podłożu z propionianem jako jedynym źródłem węgla oraz osłabienie wzrostu szczepu  $\Delta$ *msmeg4305*/ $\Delta$ *prpR*. Przeprowadzono również analizę stężenia witaminy B<sub>12</sub> w lizatach komórkowych mutantów  $\Delta$ *msmeg4305* oraz  $\Delta$ *cobIJ* *M. smegmatis* wobec szczepu dzikiego *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 przy użyciu testu immunoenzymatycznego. Niższy poziom witaminy B<sub>12</sub> w komórkach mutantu  $\Delta$ *msmeg4305* *M. smegmatis* oraz obserwowane spowolnienie wzrostu  $\Delta$ *msmeg4305*/ $\Delta$ *prpR* na podłożu z propionianem sugerują, że produkt genu *msmeg4305* jest zaangażowany w syntezę witaminy B<sub>12</sub> *in vivo*, ale jego funkcja może być częściowo wypełniana przez inne, nieznanne jeszcze enzymy.

Równolegle analizowano wpływ domeny CobC białka MSMEG4305 na domenę RNazową. Analiza krzywych wzrostu mutantów komplementowanych całym funkcjonalnym genem *msmeg4305* ( $\Delta$ *rnhA*/ $\Delta$ *msmeg4305-attB::P<sub>ami</sub>msmeg4305*) lub genem skróconym pozbawionym C-terminalnej domeny kodującej *CobC* ( $\Delta$ *rnhA*/ $\Delta$ *msmeg4305-attB::P<sub>ami</sub>msmeg4305*<sub>3'tr(199AA)</sub>) *M. smegmatis* pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że domena CobC ma niewielki wpływ na funkcjonowanie domeny RNazowej u mutantu *M. smegmatis*.

Wniosek ten wysnuto na podstawie zaobserwowanego nieznacznego zahamowania wzrostu mutantu z delecją domeny CobC ( $\Delta rn h A / \Delta m s m e g 4 3 0 5 - a t t B :: P_{a m i} m s m e g 4 3 0 5_{3' t r (199 A A)}$ ) w stosunku do mutantu ze skomplementowanym funkcjonalnym genem *msmeg4305*. Wykazano także, że poziom hybryd DNA\RNA w izolatach komórkowych pozyskanych ze szczepów komplementowanych  $\Delta rn h A / \Delta m s m e g 4 3 0 5 - a t t B :: P_{a m i} m s m e g 4 3 0 5$ ,  $\Delta rn h A / \Delta m s m e g 4 3 0 5 - a t t B :: P_{a m i} m s m e g 4 3 0 5_{3' t r (199 A A)}$  *M. smegmatis* względem szczepu dzikiego był identyczny.

W kolejnym etapie prac przeprowadzono fenotypową analizę mutantu *M. smegmatis*, u którego upośledzony jest szlak syntezy witaminy B<sub>12</sub>. Wstępne badania fenotypowe mutantu z delecją genu *msmeg4305* *M. smegmatis* z wykorzystaniem systemu BIOLOG pozwoliły na zidentyfikowanie grupy związków wpływających na metabolizm mutantu, w tym grupy substancji chemicznych zaangażowanych w metabolizm folianów w komórce. W kolejnym eksperymencie analizowano fenotyp wspomnianego mutantu, wykorzystując zjawisko „pułapki metylofolianowej”. Zaobserwowano uwrażliwienie się szczepu z delecją genu *msmeg4305* na obecność w podłożu sulfametazyny. Suplementacja podłoża kobalaminą, przy równoczesnej obecności sulfametazyny, powodowała regresję fenotypu, sugerując, iż produkt genu *msmeg4305* odgrywa istotną rolę w metabolizmie kobalaminy, a tym samym wpływa na prawidłowe funkcjonowanie komórki.

Ostatnim etapem badań była analiza czynników środowiskowych mogących wpływać na biosyntezę i akumulację kobalaminy w komórce. Analiza qRT-PCR wykazała konstytutywną lub obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm kobalaminy. Uzyskane wyniki sugerują, że zwiększony poziom witaminy B<sub>12</sub> w komórce jest wynikiem jej akumulacji w komórkach mykobakterii, a nie zwiększonej ekspresji genów uczestniczących w szlaku biosyntezy kobalaminy u *M. smegmatis*.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że chociaż geny związane z witaminą B<sub>12</sub> nie są niezbędne dla metabolizmu prątków, to są one istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki poprzez regulację szlaków metabolicznych – cyklu metylomalonylowego i metabolizmu kwasu foliowego. Uzyskane wyniki sugerują również, że produkt genu *msmeg4305* jest zaangażowany w syntezę witaminy B<sub>12</sub> *in vivo*.

.....  
miejscowość i data

.....  
podpis