

Mimo intensywnych prac badawczych oraz dedykowanych programów WHO gruźlica pozostaje jednym z najważniejszych wyzwań epidemiologicznych XXI wieku wśród chorób infekcyjnych. Wg raportu WHO co roku z powodu gruźlicy umiera około 1,5 mln ludzi a około 9,6 mln osób ulega zakażeniu. Gruźlica lekowrażliwa (powstająca w wyniku zakażenia prątkami wrażliwymi na podstawowe tuberkulostatyki) jest chorobą w pełni uleczalną, choć eradykacja prątków wymaga aż sześciomiesięcznego procesu leczenia i konieczności codziennego przyjmowania „koktajlu” początkowo czterech (2 miesiące) a następnie 2 leków. Narastającym problemem epidemiologicznym i wyzwaniem dla służby zdrowia na całym świecie są prątki leko- i wielolekooporne, których eradykacja wymaga nawet dwuletniej terapii, jest bardzo kosztowna i w ponad 50% przypadków kończy się niepowodzeniem. Leczenie gruźlicy, nawet lekowrażliwej, jest skomplikowane ze względu na charakter prątków: powolny wzrost, łatwość rozwoju lekooporności oraz zdolność do przeżywania w stanie latencji. Mykobakterie, w tym prątki gruźlicy, są naturalnie odporne na wiele antybiotyków, co spowodowane jest wysoką hydrofobowością ściany komórkowej działającej jako skuteczna bariera przepuszczalności. Ponadto prątki mają łatwość nabywania oporności na leki poprzez akumulacje mutacji w genach kodujących ich miejsca docelowe (np. oporność na rifampicyne warunkowana punktowymi mutacjami w genie kodującym podjednostkę  $\beta$  polimerazy RNA, oporność na streptomycynę wynikająca z akumulacji mutacji w genach kodujących rybosomalne RNA lub białko) bądź kodujących enzymy niezbędne dla wewnątrzkomórkowej aktywacji proleku (np. izoniazyd do aktywacji wymaga mykobakteryjnego enzymu o aktywności katalazy/peroksydazy). Oporność wielolekowa jest warunkowana poprzez akumulacje mutacji odpowiedzialnych za oporność na pojedyncze leki. Obecnie stosowane leki przeciwgruźlicze są inhibitorami zaledwie kilka niezbędnych dla prątków procesów komórkowych takich jak synteza elementów ściany komórkowej (np. izoniazyd, pirazynamid, etambutol), transkrypcja (rifampicyna), translacja (streptomycyna, kanamycyna). Dlatego też ogromnym wyzwaniem współczesnej farmakologii jest nie tylko zwiększenie puli dostępnych w leczeniu gruźlicy leków ale także identyfikacja aktywnych biologicznie substancji zdolnych do interakcji z innymi, niezbędnymi dla mykobakterii procesami komórkowymi.

Wybór optymalnego miejsca docelowego dla potencjalnych leków wymaga przeprowadzenia wielokierunkowych badań pozwalających na eksperymentalną ocenę efektu obniżenia jego stężenia na metabolizm prątków poprzez analizy zdolności do wzrostu, badania transkryptomiczne i/lub proteomiczne, a także określenie funkcji badanej tarczy molekularnej w metabolizmie bakterii.

**Taka szczegółowa molekularna charakterystyka enzymów metabolizmu RNA (PAP I i PNP) jako potencjalnych miejsc docelowych dla nowych leków przeciwgruźliczych jest celem niniejszego projektu.**

Realizacja projektu pozwoli na określenie minimalnego, pozwalającego na wzrost prątków gruźlicy, stężenia wybranych enzymów metabolizmu RNA, PAP I oraz PNP. Zbadanie wrażliwości obu enzymów na znane i potencjalne inhibitory polimeraz DNA i RNA. Określenie minimalnego stężenia inhibitorów PAP I i/lub PNP hamującego wzrost prątków gruźlicy z fizjologicznym oraz obniżonym poziomem badanych enzymów. Rola poliadenylacji mRNA w adaptacji prątków gruźlicy do określonych warunków środowiska, w tym wewnątrzkomórkowego środowiska ludzkich makrofagów, zostanie oceniona na poziomie globalnej analizy transkryptomu szczepów z obniżonym lub podwyższonym poziomem badanych białek, rosnących w określonych warunkach środowiska, w tym po wzbogaceniu frakcji mRNAs zawierających sekwencje poli(A). Zbadana zostanie wrażliwość mykobakterii charakteryzujących się obniżonym poziomem PAP I i/lub PNP na szereg czynników uszkodzających DNA. Poprzez przygotowanie białek fuzyjnych, współcyszczanie kompleksów białkowych i ich identyfikację metodą spektrometrii mas, scharakteryzowane zostaną białka wiążące PAP I i/lub PNP w prątkach gruźlicy, ze szczególnym zwróceniem uwagi na białka naprawy DNA. Zbadana zostanie zdolność wiązania białek PAP I i/lub PNP do biblioteki jedno i dwuniciowych substratów DNA, również w obecności białek partnerskich, oraz zbadana zostanie aktywność ww. enzymów z zastosowaniem różnorodnych matryc DNA, RNA i RNA/DNA. Zidentyfikowane białka partnerskie, matryce DNA i RNA oraz aktywności enzymatyczne pozwolą na zrekonstruowanie procesu naprawy DNA w warunkach in vitro z udziałem PAP I i/lub PNP.