

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-0499**

**Nové aspekty v biogenéze mykobakteriálneho bunkového obalu: funkčná charakterizácia proteínov kódovaných génovým klastrom rv1459c-rv1456c.**

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Jana Korduláková, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Dpt. of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, USA (Dr. M. Jackson, Dr. D. Chatterjee)
2. Institute of Pharmacology and Structural Biology, Toulouse, Francúzsko (prof. G. Puzo)
3. Unidad de Biofisica (CSIC-UPV/EHU), Leioa, Španielsko (Dr. M. Guerin)

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1. neboli
- 2.
- 3.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Škovierová, H., Larrouy-Maumus, G., Zhang, J., Kaur, D., Barilone, N., Korduláková, J., Gilleron, M., Guadagnini, S., Beláňová, M., Prevost, M. C., Gicquel, B., Puzo, G., Chatterjee, D., Brennan, P. J., Nigou, J., Jackson, M. (2009) AftD, a novel essential arabinofuranosyltransferase from mycobacteria. *Glycobiology*. 19(11): 1 235 – 47
2. Korduláková, J., Beláňová, M., Škovierová, H., Poláková, M., Zhang, J., Chatterjee, D., Mikušová, K., Jackson, M. The Functional Characterization of Rv1459c in Mycobacteria. Eurocarb 15. – Vienna, Austria, 19-24 July 2009. - S. 293
3. Škovierová, H., Zhang, J., Kaur, D., Korduláková, J., Chatterjee, D., Jackson, M. (2009) AftD,

- a Novel Arabinofuranosyltransferase from Mycobacteria. Annual Meeting of the Society for Glycobiology – San Diego, USA, 12-15 November 2009, publ. In Glycobiology. 19(11): 1322
4. Korduláková, J. New trends in the fight against tuberculosis. Progress in Biology 2009, Nitra : UKF, 2009, ISBN 978-80-8094-595-4 - S. 16
5. Bystrický, M., Beláňová, M., Jackson, M., Mikušová, K., Korduláková, J., Biochemical characterization of Rv1459c protein - putative GT-C glycosyltransferase from mycobacteria. 22. biochemický zjazd. Martin, 8. - 12- 9. 2010, ISBN 978-80-88866-83-1 - S. 195

## **Uplatnenie výsledkov projektu**

Výsledky riešeného projektu prinášajú nové poznatky o biosyntéze mykobakteriálneho arabinánu. Táto biosyntetická dráha je validovaným cieľom pre pôsobenie účinných antituberkulotík: V súčasnosti používané antituberkulotikum etambutol, ako aj nová trieda extrémne účinných antimykobakteriálnych inhibítorov - benzotiazinóny pôsobia práve na enzýmy zapojené do výstavby arabinánovej zložky mykobakteriálneho bunkového obalu. Študované arabinozyltransferázy Rv1459c a AftD sú v testovaných podmienkach esenciálne pre *M. smegmatis* a vzhľadom na ich lokalizáciu v bunkovej stene sú prístupné pre účinné pôsobenie inhibujúcich látok.

Fúzia Rv1459c s maltózu-viažucim proteínom umožnila heterológnu produkciu tohto extrémne hydrofóbného proteínu v *E. coli*, jeho izoláciu pomocou afinitnej chromatografie a následne kryštalizáciu. Navrhujeme, že túto metodiku možno aplikovať aj na ostatné mykobakteriálne glykozyltransferázy z GT-C rodiny, ktorých produkcia, izolácia a kryštalizácia sú obtiažne.

## **CHARAKTERISTIKA VÝSLEDKOV**

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku** (max. 20 riadkov)

Projekt bol zameraný na odhalenie funkcie predpokladanej glykozyltransferázy Rv1459c a pravdepodobného ABC transportéra Rv1458c-Rv1456c v kontexte výskumu nových aspektov v biosyntéze bunkovej steny mykobaktérií. Naše výsledky ukázali, že:

1. Gén *rv1459c* kóduje arabinozyltransferázu, pričom jeho expresia v *M. smegmatis* vedie k stimulácii biosyntézy arabinánu a k produkcii alternatívnych foriem mykobakteriálnych lipopolysacharidov.
2. Ortológ génu *rv1459c* je pre *M. smegmatis* v testovaných podmienkach esenciálny.
3. Arabinozyltransferázu Rv1459c, ktorá patrí medzi vysoko hydrofóbne GT-C glykozyltransferázy možno heterológne produkovať v *E. coli* vo forme fúzie s maltózu viažucim proteínom. Fúzny proteín MBP-Rv1459c sa nám podarilo izolovať a kryštalizovať.
4. Študovaný ABC transportér sa zúčastňuje syntézy arabinánovej zložky arabinogalaktánu a lipoarabinomanánu. Podarilo sa nám prerušiť a čiastočne deletovať gény kódujúce transmembránové podjednotky tohto transportéra a potvrdiť jeho účasť v tejto metabolickej dráhe. Ukázali sme, že koprodukcia jeho transmembránovej a nukleotid-viažucej podjednotky výrazne stimuluje ATPázovú aktivitu membránovej frakcie *E. coli*.
5. Arabinozyltransferáza Rv1459c priamo interaguje s jednotlivými podjednotkami študovaného ABC transportéra.
6. Glykozyltransferáza AftD kódovaná génom *rv0236c* predstavuje ďalšiu arabinozyltransferázu, ktorá sa zúčastňuje biosyntézy mykobakteriálneho bunkového obalu, pričom jej ortológ v *M. smegmatis* je v testovaných podmienkach esenciálny.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku** (max. 20 riadkov)

The aim of the project was to reveal the functions of the putative glycosyltransferase Rv1459c and the putative ABC transporter Rv1458c-Rv1456c in the context of investigation of the novel aspects of biogenesis of the mycobacterial cell wall. The most important results

emerging from our work showed that:

1. The gene rv1459c encodes arabinosyltransferase and its expression in *M. smegmatis* stimulates arabinan biosynthesis and the production of alternative forms of mycobacterial lipopolysaccharides.
2. The orthologue of the gene rv1459c is for *M. smegmatis* essential in tested conditions.
3. We succeeded in producing the arabinosyltransferase Rv1459c - highly hydrophobic protein from the GT-C family of glycosyltransferases in *E. coli* in the form of fusion with maltose binding protein. We were also able to purify and crystallize this fusion protein.
4. The studied ABC transporter is involved in the synthesis of arabinan part of arabinogalactan and lipoarabinomannan. We disrupted and partially deleted the genes encoding the transmembrane domains of this transporter and confirmed its role in this metabolic pathway. We showed that co-production of its transmembrane and nucleotide-binding domains markedly stimulates ATPase activity of membrane fraction of *E. coli*.
5. Arabinosyltransferase Rv1459c directly interacts with each of the subunits of studied ABC transporter.
6. AftD encoded by the gene rv0236c is another arabinosyltransferase involved in the biosynthesis of mycobacterial arabinan and its orthologue in *M. smegmatis* is essential.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

**Zodpovedný riešiteľ**

RNDr. Jana Korduláková, PhD.

V Bratislave 22.6.2011

**Štatutárny zástupca príjemcu**

doc. RNDr. Milan Trizna, PhD.

V Bratislave 27.6.2011

.....  
podpis zodpovedného riešiteľa

.....  
podpis štatutárneho zástupcu príjemcu