

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0515****Topologické aspekty biosyntézy mykobakteriálneho arabinogalaktánu**Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Katarína Mikušová, PhD.**Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Prírodovedecká fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

1. Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town, Južná Afrika
2. Biologické centrum Akadémie vied ČR, České Budějovice, Česká republika
3. University of Vienna, Department of Microbiology and Ecosystem Science, Division of Microbial Ecology, Viedeň, Rakúsko
4. Mycobacteria Research Laboratories, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, USA

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

-

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

1. Huszár, S., V. Singh, A. Polčicová, P. Baráth, M. B. Barrio, S. Lagrange, V. Leblanc, C. A. Nancy, V. Mizrahi and K. Mikušová (2017). "N-Acetylglucosamine-1-Phosphate Transferase, WecA, as a Validated Drug Target in Mycobacterium tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother 61(11)
2. Karabanovich, G.; Dušek, J.; Savková, K.; Pavliš, O.; Pávková, I.; Korábečný, J.; Kučera, T.; Kočová Vlčková, H.; Huszár, S.; Konyariková, Z.; Konečná, K.; Jandourek, O.; Stolaříková, J.; Korduláková, J.; Vávrová, K.; Pávek, P.; Klimešová, V.; Hrabálek, A.; Mikušová, K.; Roh, J., Development of 3,5-Dinitrophenyl-Containing 1,2,4-Triazoles and Their Trifluoromethyl Analogues as Highly Efficient Antitubercular Agents Inhibiting Decaprenylphosphoryl-b-D-ribofuranose 2'- Oxidase. Journal of Medicinal Chemistry 2019, 62 (17), 8115-8139
3. Konyariková, Z., K. Savková, S. Kozmon and K. Mikušová (2020). "Biosynthesis of Galactan in Mycobacterium tuberculosis as a Viable TB Drug Target?" Antibiotics 9(1)
4. Baráth, M., J. Jakubčinová, Z. Konyariková, S. Kozmon, K. Mikušová and M. Bella (2020). "Synthesis, docking study and biological evaluation of D-fructofuranosyl and D-tagatofuranosyl sulfones as potential inhibitors of the mycobacterial galactan synthesis targeting the galactofuranosyltransferase GlfT2." Beilstein J Org Chem 16: 1853-1862. Doi:

10.3762/bjoc.16.152

5. Li, M., H. Gašparovič, X. Weng, S. Chen, J. Korduláková and C. Jessen-Trefzer (2020). "The two-component locus MSMEG_0244/0246 together with MSMEG_0243 affects biofilm assembly in *M. smegmatis* correlating with changes in phosphatidylinositol mannosides acylation." *Front Microbiol* 11: 570606. Doi: 10.3389/fmicb.2020.570606

Práca v recenznom konaní:

Karin Savková (UK), Stanislav Huszár (UK), Peter Baráth (SAV), Zuzana Pakanová (SAV), Stanislav Kozmon (SAV), Marie Vancová (AV ČR), Martina Tesařová (AV ČR), Jaroslav Blaško (UK), Michal Kaliňák (STU), Vinayak Singh (UCT), Jana Korduláková (UK), Katarína Mikušová (UK) "An ABC transporter Wzm-Wzt catalyzes translocation of lipid-linked galactan across the plasma membrane in mycobacteria"

Podaná: 15.11.2020 do PNAS. Aktuálne: v recenznom konaní (modifikovaná verzia bude podaná v priebehu februára 2021).

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu prispievajú k porozumeniu biosyntézy mykobakteriálnej bunkovej steny, ktorá predstavuje významný a citlivý cieľ pre vývoj nových antituberkulotík.

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

Bunkový obal *Mycobacterium tuberculosis* slúži ako hlavná ochranná bariéra patogénu, ktorý si každoročne vyžiada viac ako milión životov. Jeho základom je jadro bunkovej steny zložené z kovalentne viazaného peptidoglykán, rozvetveného heteropolysacharidu arabinogalaktánu a mykolových kyselín. Výstavba tejto štruktúry umiestnenej na povrchu baktérií vyžaduje zapojenie enzýmov pôsobiacich na obidvoch stranách plazmatickej membrány, ako aj translokáciu metabolických medziproduktov z cytoplazmy do periplazmatického priestoru. Dôležitým výsledkom tohto projektu je funkčná charakterizácia ABC transportéra, ktorý katalyzuje translokáciu prekurzorov galaktánu cez plazmatickú membránu. Využili sme metódu CRISPR interferencie v *M. smegmatis* na prípravu kmeňov s regulovateľnou expresiou zložiek tohto transportéra, transmembránovej a nukleotid-viažucej podjednotky. Ukázali sme, že inhibícia ich produkcie vedie k morfológickým zmenám a k akumulácii neobvykle dlhého galaktánového prekurzora v mykobaktériách. V našej práci sa po prvýkrát podarilo izolovať tento materiál z buniek a charakterizovať jeho štruktúru. Na základe našich výsledkov sme navrhli model koordinovanej syntézy a exportu prekurzora galaktánu v mykobaktériách, čo predstavuje zásadne nové informácie ohľadom biogenézy štruktúry kritickej pre prežitie patogénu. Okrem toho sme skúmali účinky vybraných zlúčenín navrhnutých našimi domácimi a zahraničnými spolupracovníkmi na metabolické dráhy zapojené do výstavby arabinogalaktánu s cieľom overiť ich inhibičný potenciál. Nové metodiky vypracované v rámci tohto projektu budú použité v našom ďalšom úsilí o objasnenie aspektov biogenézy bunkových stien mykobaktérií.

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

The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* serves as a primary protective barrier of the pathogen, which claims more than a million lives each year. Its basis, the unique mycobacterial cell wall core, is composed of covalently linked peptidoglycan, branched heteropolysaccharide arabinogalactan and mycolic acids. Construction of this complex structure located on the bacterial surface requires an array of enzymes acting on both sides of the plasma membrane, as well as translocation of metabolic intermediates from cytoplasm to periplasmic space. The major achievement of this project is the functional characterization an ABC transporter involved in translocation of galactan precursors across the plasma membrane. We used CRISPR interference in *M. smegmatis* to construct genetic knockdowns of the two subunits of the transporter – transmembrane and nucleotide binding domains. Inhibition of their production results in severe morphological changes and accumulation of an aberrantly long galactan precursor. This allowed isolation and a detailed structural characterization of this metabolic intermediate for the first time. Based on our data we proposed a model for coupled synthesis and export of the galactan polymer precursor in mycobacteria providing an important new insight into biogenesis of a structure critical for the pathogen survival. In addition we explored the potential of the critical pathways involved in

construction of the arabinogalactan portion of the mycobacterial cell envelope to serve as targets of specific compounds designed by our collaborators from Slovak and foreign scientific institutions. Novel methodologies developed during this project will be applied in our further efforts to elucidate aspects of mycobacterial cell wall biogenesis.