

Związki steroidowe są substratami wykorzystywanymi przez bakterie jako źródło węgla i energii (Bragin i wsp., 2013). Stanowią także łatwo dostępny i tani surowiec dla przemysłu farmaceutycznego. Preparaty oparte na steroidach znalazły zastosowanie między innymi jako leki przeciwzapalne, przeciwalergiczne, hormonalne, przeciwnowotworowe (Garcia i wsp., 2012; Donova i wsp., 2012; Świzdor i wsp., 2012). Szybkorosnące mykobakterie glebowe efektywnie przeprowadzają procesy degradacji łańcucha bocznego, hydroksylacji i izomeryzacji podwójnego wiązania (C5-C6) steroli do formy 3-keto-4-en (androstanowej) wytwarzając związki, które stanowią kluczowe substraty do produkcji steroidów o znaczeniu farmakologicznym.

Od kilku lat wiadomo, że degradacja steroli poza znaczeniem przemysłowym pełni także ważną rolę w patogenezie prątków. Pojawia się coraz więcej danych próbujących wyjaśnić funkcję cholesterolu w procesach wirulencji. Wykazano, że mutanty *M. tuberculosis*, niezdolne do transportu (Sasseti i wsp., 2003; Joshi i wsp., 2006) lub degradacji (Chang i wsp., 2007; Nesbitt i wsp., 2010) cholesterolu są atenuowane na liniach komórkowych oraz na zwierzęcych modelach gruźlicy. Obecność cholesterolu w błonie komórkowej makrofagów oraz w membranie fagosomów jest niezbędna prątkom gruźlicy do wnikania do wnętrza tych komórek oraz późniejszego wewnątrzkomórkowego przeżywania (Gatfield i wsp., 2000). Wyniki najnowszych badań pozwalają przypuszczać iż cholesterol pełni ważną rolę w interakcji patogen – gospodarz (Mattos i wsp., 2014).

Badania, przeprowadzone w ramach niniejszej pracy, pozwoliły na dokładniejsze zrozumienie molekularnego podłoża degradacji steroli (cholesterolu oraz β -sitosterolu) przez szczep *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Cholesterol wybrano jako przykład sterolu z nierozgałęzionym łańcuchem bocznym, β -sitosterol natomiast jako przedstawiciela grupy steroli z rozgałęzionym łańcuchem alifatycznym przy węglu 24. Ponieważ niewiele jest danych literaturowych, odnoszących się do genów związanych z degradacją łańcucha alifatycznego steroli, w pracy podjęto próbę określenia roli produktów genów *fadD19*, *echA19*, które sugerowane są jako zaangażowane w degradację łańcucha bocznego związków steroidowych. Mutanty *M. smegmatis* mc²155 ($\Delta fadD19$, $\Delta echA19$) uzyskano na drodze homologicznej rekombinacji, podczas której funkcjonalne geny zostały zastąpione genami nieaktywnymi, niosącymi wewnętrzną delecję. Usunięcie funkcjonalnej kopii genów *fadD19*, *echA19* w mutantach typu DCO pozwoliło stwierdzić, że żaden z tych genów nie jest niezbędny dla wzrostu *M. smegmatis* mc²155 w warunkach *in vitro*. Następnie analizowano zdolności *M. smegmatis* mc²155 oraz rekombinantów $\Delta fadD19$, $\Delta echA19$ do degradacji

cholesterolu, z użyciem metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS/MS).

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że zarówno szczep *M. smegmatis* mc²155 jak i mutanty $\Delta fadD19$, $\Delta echA19$ zdolne są do wykorzystania cholesterolu jako jedyne źródła węgla i energii. Nie wykazano istotnych różnic w dynamice wzrostu oraz w tempie zużycia substratu przez mutanty $\Delta fadD19$, $\Delta echA19$ w odniesieniu do szczepu wyjściowego. Natomiast, dzięki skriningowej analizie chromatograficznej wyodrębniono różnice pomiędzy metabolitami, które powstały podczas degradacji łańcucha alifatycznego cholesterolu. Analiza chromatograficzna ekstraktów hodowli *Mycobacterium smegmatis* mc²155 oraz mutantów $\Delta fadD19$, $\Delta echA19$ z dodatkiem cholesterolu, wykazała obecność 3 nowych produktów pośrednich, które wyróżniały się wśród wszystkich analizowanych układów. Metabolity pojawiały się w hodowlach wszystkich badanych szczepów, przy czym ich ilość była zmienna w czasie. Ciekawą zależność odnotowano dla obu mutantów, w przypadku których dwa metabolity 21-węglowe z częściowo zachowanym łańcuchem bocznym (metabolit nr 2, metabolit nr 3), były obecne w większej ilości w późniejszych godzinach hodowli, w porównaniu do szczepu *Mycobacterium smegmatis* mc²155, co może wskazywać na opóźnienie procesu degradacji łańcucha bocznego tego sterolu przez mutanty $\Delta fadD19$ i $\Delta echA19$.

W drugiej części pracy analizowano procesy degradacji β -sitosterolu przez szczep *M. smegmatis* mc²155 oraz skonstruowane mutanty: $\Delta fadD19$, $\Delta echA19$. Dodatkowo do badań włączono mutanty: $\Delta kstD1$, $\Delta kstD2$, $\Delta (kstD1-kstD2)$, $\Delta choD$, $\Delta hsdD$, które były pozbawione genów kodujących enzymy zaangażowane w degradację struktury pierścieniowej cholesterolu. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że mutant $\Delta fadD19$ nie jest zdolny do wykorzystania tego substratu jako jedyne źródła węgla i energii, co sugeruje, że produkt genu *fadD19* może pełnić kluczową rolę w procesie degradacji łańcucha alifatycznego steroli z rozgałęzieniem przy C 24 u *Mycobacterium smegmatis*. Bezpośrednim potwierdzeniem zaangażowania FadD19 w początkowy etap degradacji β -sitosterolu była zdolność mutantu $\Delta fadD19$ *Mycobacterium smegmatis* do degradacji 1,4-BNC (kwas 3-oxo-23,24-bisnorchola-1,4-dien-22-owy), który jest związkiem z częściowo zachowanym łańcuchem alifatycznym. Pozostałe mutanty były zdolne do degradacji β -sitosterolu, przy czym obserwowano różnicę w tempie zużywania substratu. W pracy monitorowano występowanie metabolitów pośrednich degradacji β -sitosterolu: 1,4-

BNC oraz ADD (1,4-androstadien-3,17-dion). Dla mutantów $\Delta echA19$, $\Delta kstD1$, $\Delta(kstD1-kstD2)$ odnotowano istotne różnice czasowe w ilości występowania produktów pośrednich w hodowli. Może to wskazywać, że inaktywacja genu *echA19* oraz *kstD1* lub równoczesna inaktywacja *kstD1* i *kstD2* u *M. smegmatis* mc²155 spowalnia proces degradacji β -sitosterolu. Dodatkowo, przeprowadzona analiza jakościowa pozwoliła zidentyfikować nowy produkt pośredni degradacji β -sitosterolu, który był akumulowany w późniejszych godzinach hodowli mutantu $\Delta kstD1$ *M. smegmatis*.

Podczas analizy chromatograficznej degradacji β -sitosterolu najciekawsze wyniki uzyskano dla mutantu $\Delta fadD19$ oraz $\Delta kstD1$ *M. smegmatis*. Dla tych rekombinantów skonstruowano szczepy komplementarne. Ponieważ proces biodegradacji β -sitosterolu przez mutanty $\Delta fadD19:: P_{fadD19}fadD19$ oraz $\Delta kstD1:: P_{kstD1}kstD1$ przebiegał podobnie w porównaniu do szczepu *M. smegmatis* mc²155, stwierdzono, że zmiany w fenotypie mutantu $\Delta fadD19$ oraz $\Delta kstD1$ względem szczepu „dzikiego” wynikają bezpośrednio z faktu inaktywacji powyższych genów, a nie są spowodowane potencjalnym efektem polarnym na inne geny.

W prezentowanej pracy wykazano po raz pierwszy, że produkt genu *fadD19* pełni istotną funkcję w początkowym etapie degradacji β -sitosterolu u *M. smegmatis* mc²155. Dodatkowo, uzyskane wyniki pozwoliły również stwierdzić, że brak funkcjonalnych genów *kstD1* oraz *echA19* spowalniał proces degradacji β -sitosterolu u *M. smegmatis* mc²155.