

**Celem projektu jest wykazanie, że pobierana z zewnątrz witamina B12 jest niezbędna dla prątka gruźlicy *Mycobacterium tuberculosis* do podtrzymania syntezy lipidów ściany komórkowej, niezbędnych do przetrwania w komórce gospodarza a tym samym może być wykorzystana w projektowaniu koniugatów typu "Koń trojański", w których pełnić będzie rolę nośnika molekularnego, ułatwiającego dostarczanie leków przeciwgruźliczych poprzez ścianę komórkową prątka.**

Do czasu pandemii SARS-CoV-2 gruźlica, choroba wywoływana przez pałeczkę *Mycobacterium tuberculosis*, była główną przyczyną zgonów z powodu pojedynczego czynnika zakaźnego na świecie. Globalny wzrost częstości występowania przypadków gruźlicy o rozszerzonej oporności na leki stale przypomina nam o potrzebie badań nad metabolizmem *M. tuberculosis* w celu identyfikacji słabych punktów, które mogą zostać wykorzystane w projektowaniu nowych leków przeciwgruźliczych. *M. tuberculosis* jest fakultatywnym, wewnątrzkomórkowym patogenem makrofagów i innych komórek odpornościowych. Stwarza to co najmniej dwie przeszkody na drodze do penetracji leku przeciwgruźliczego z krwi do celu wewnątrz komórki bakterii. Pierwsza to słabo przepuszczalna ściana komórkowa prątka, a druga to różnorodne typy komórek, tkanek i zmian ogniskowych gospodarza, które musi przemierzyć, zanim dotrze do patogenu. Dlatego wraz z projektowaniem nowych leków przeciwgruźliczych celowe wydaje się badanie nowych sposobów ich dostarczenia do komórki w celu zwiększenia skutecznej dawki, uniknięcia nabywania tolerancji dla leku i skrócenia leczenia. Koniugacja typu "Koń trojański" jawi się jako obiecująca metoda modyfikacji antybiotyków. W nawiązaniu do mitologicznego pochodzenia nazwy, antybiotyk jest tutaj sprzęgany z cząsteczką docelową, którą jest zwykle niezbędny dla przetrwania bakterii składnik odżywczy, który bakteria zmuszona jest pobierać ze środowiska wzrostu poprzez wiązanie ze specyficznymi receptorami osłon komórkowych. Umożliwia to wykorzystanie dedykowanych systemów transportu nośnika do przetransportowania antybiotyku do wnętrza komórki bakterii. Podczas gdy tradycyjne antybiotyki dostają się do komórki na drodze niespecyficznego dyfuzji biernej, koniugaty typu "Koń trojański" uzyskują dostęp do jej wnętrza poprzez aktywny transport, co skutkuje wewnątrzkomórkową akumulacją leku wbrew gradientowi stężeń, selektywną aktywnością względem bakterii i zmniejszoną toksycznością.

W naszym projekcie pragniemy zbadać potencjał witaminy B12 (kobalaminy, Cbl) jako nośnika dla związków przeciwprątkowych. Początkowo, w badaniach wstępnych, wykazano niezdolność *M. tuberculosis* do syntezy endogennej witaminy B12 i całkowitą zależność od jej egzogenego wychwytu, co stanowi "piętę achillesową" metabolizmu prątków gruźlicy w organizmie gospodarza i jest w tym przypadku podstawowym warunkiem kwalifikacji danej molekuly jako nośnika. Pobieranie witaminy B12 jest niezbędne do długotrwałego przetrwania *M. tuberculosis* w organizmie gospodarza, co stanowi drugi, konieczny warunek dla potencjalnego nośnika, jednakże mechanizm metaboliczny, poprzez który B12 bierze udział w patogenezie gruźlicy, pozostaje słabo poznany. Na podstawie wstępnych badań sformułowano hipotezę, iż witamina B12 może być kluczowym regulatorem syntezy lipidów wirulencji ściany komórkowej *M. tuberculosis*, warunkując możliwość przetrwania wewnątrz a następnie ucieczki z komórki fagocytarnej gospodarza.

Dlatego w pierwszej części projektu, poprzez zastosowanie sekwencjonowania masowego mRNA (RNA-Seq) prątka gruźlicy, hodowanego na zróżnicowanych źródłach węgla z witaminą B12 lub bez niej, chcielibyśmy zidentyfikować wszystkie, potencjalne, zależne od witaminy B12, szlaki metaboliczne tego drobnoustroju. Poprzez konstrukcję mutantów w obrębie szlaków metabolicznych zależnych od witaminy B12 a następnie badanie ich wzrostu w różnych warunkach *in vitro* i w ludzkich fagocytach oraz izolację i analizę lipidów kluczowych w wirulencji chcielibyśmy wyjaśnić mechanizm, na drodze którego witamina B12 umożliwia przeżycie prątka w organizmie gospodarza.

Następnie, druga część projektu ma na celu syntezę biokoniugatów witaminy B12 z obecnie stosowanymi lekami przeciwgruźliczymi (Bedakilina, Rifampicyna, Etambutol, Amikacyna) oraz dwiema nowymi pochodnymi 1H-benzo[d]imidazolu, których działanie przeciwprątkowe wykazano w naszych wcześniejszych badaniach i zweryfikowanie *in vitro* oraz wewnątrz ludzkich makrofagów, czy koniugacja z witaminą B12 poprawia ich aktywność wobec *M. tuberculosis*. Poprzez zastosowanie antybiotyków o zróżnicowanych właściwościach i strukturze chcielibyśmy zweryfikować, jakie właściwości fizyczne, chemiczne i strukturalne są bardziej podatne na wykorzystanie w koniugacji z witaminą B12, wykazując oczekiwany, korzystny wpływ na przenikanie leku do komórki prątka. Aktywność zsyntetyzowanych biokoniugatów zostanie przetestowana *in vitro* na laboratoryjnym szczepie prątka gruźlicy w zróżnicowanych warunkach metabolicznych w odniesieniu do aktywności leków nieskoniugowanych. Po ocenie cytotoksyczności działanie wybranych, obiecujących koniugatów zostanie następnie przetestowane na prątkach gruźlicy znajdujących się wewnątrz ludzkich fagocytów. Biorąc pod uwagę bardzo ograniczoną liczbę skutecznych leków stosowanych w leczeniu gruźlicy, koniugacja z nośnikiem może stanowić przełomową metodę rozszerzającą asortyment leków przeciwgruźliczych nie tylko o nowe klasy związków, ale także o istniejące antybiotyki nie stosowane w terapii ze względu na niską penetrację osłon komórkowych prątka, niską rozpuszczalność i/lub konieczność podawania w dużych dawkach, stwarzających ryzyko wystąpienia poważnych działań niepożądanych.