

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Magdalena Antczak

Analiza funkcjonalna wybranych, „sierocych” białek regulatorowych dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału u mykobakterii

Functional analysis of selected, “orphan” regulatory proteins belonging to mycobacterial two-component signal transduction systems

Praca doktorska wykonana w Pracowni
Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi

Promotor:

- Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Promotor pomocniczy:

- Dr Renata Płocińska

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi,
oraz całemu zespołowi
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium,
w szczególności
Pani dr Renacie Płocińskiej
za wsparcie merytoryczne,
przekazaną wiedzę i doświadczenie,
cenne uwagi i sugestie w trakcie realizacji pracy,
a także za życzliwość i wszelką pomoc.*

A. Spis treści

A.	Spis treści	3
B.	Wykaz stosowanych skrótów	10
1.	Wstęp.....	12
1.1.	Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Mycobacterium</i>	12
1.2.	Regulacja ekspresji genów	13
1.2.1.	Regulacja ekspresji genów z udziałem czynników transkrypcyjnych	13
1.3.	Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCS).....	15
1.3.1.	Kinaza histydynowa	15
1.3.2.	Białka regulatorowe	16
1.3.3.	Ewolucja ścieżek sygnałowych	16
1.3.4.	TCS zaangażowane w przeżywalność bakterii	16
1.3.5.	TCS u mykobakterii	17
1.3.5.1.	SenX3 – RegX3 (Rv0490 – Rv0491).....	18
1.3.5.2.	Rv0600c – Rv0601c – Rv0602c.....	19
1.3.5.3.	PhoP – PhoR (Rv0757 – Rv0758).....	19
1.3.5.4.	NarL – NarS (Rv0844c – Rv0845)	19
1.3.5.5.	PrrA – PrrB (Rv0903c – Rv0902c).....	20
1.3.5.6.	MprA – MprB (Rv0981 – Rv0982).....	20
1.3.5.7.	KdpD – KdpE (Rv1028c – Rv1027c)	20
1.3.5.8.	TrcR – TrcS (Rv1033c – Rv1032c)	21
1.3.5.9.	DosR – DosS – DosT (Rv3133c – Rv3132c – Rv2027c)	21
1.3.5.10.	MtrA – MtrB (Rv3246c – Rv3245c).....	21
1.3.5.11.	TcrX – TcrY (Rv3765c – Rv3764c).....	22
1.3.5.12.	PdtaR – PdtaS (Rv1626 – Rv3220c).....	22
1.3.6.	Inne „sierocę” kinazy i białka regulatorowe	23

1.3.6.1.	Rv0195	23
1.3.6.2.	Rv0260c (Msmeg_0432) – NnaR	24
1.3.6.3.	Rv0818 (Msmeg_5784) – GlnR.....	24
1.4.	Metabolizm azotu u bakterii.....	25
1.4.1.	Transport jonów amonowych.....	25
1.4.2.	Alternatywne źródła azotu	26
1.4.3.	Asymilacja azotu	29
1.4.3.1.	Dehydrogenaza glutaminianowa	29
1.4.3.2.	Cykl syntetaza glutaminowa/syntaza glutaminianowa	30
1.4.3.3.	Syntetaza glutaminowa	30
1.4.3.4.	Syntaza glutaminianowa	31
1.4.4.	Regulatory metabolizmu azotu.....	32
1.4.4.1.	GlnR	32
1.4.4.2.	AmtR	34
1.4.4.3.	Białko P _{II}	35
2.	Cel pracy	37
3.	Materiały	38
3.1.	Szczepy bakteryjne.....	38
3.2.	Syntetyczne oligonukleotydy DNA wykorzystane w pracy.....	38
3.3.	Wektory plazmidowe	41
3.4.	Enzymy.....	48
3.5.	Mieszaniny reakcyjne.....	49
3.6.	Podłoża mikrobiologiczne	51
3.7.	Antybiotyki oraz inne substancje dodawane do podłoży mikrobiologicznych.....	53
3.8.	Odczynniki	53
3.9.	Bufory i roztwory	54

3.9.1.	Bufory do przeprowadzania procesu elektroforezy.....	54
3.9.2.	Bufory obciążające	55
3.9.3.	Bufory do oczyszczania i doczyszczania białek	55
3.9.4.	Bufory do hybrydyzacji metodą Southerna.....	56
3.9.5.	Bufory do przygotowania komórek kompetentnych.....	57
3.9.6.	Bufory i roztwory wykorzystane w metodzie western blot.....	57
3.9.7.	Bufory użyte w metodzie Pull-down.....	58
3.9.8.	Inne bufory i roztwory.....	58
3.10.	Żele do rozdziału elektroforetycznego	58
3.11.	Markery wielkości.....	59
3.12.	Zestawy komercyjne	59
3.13.	Pozostałe odczynniki i materiały.....	60
3.14.	Aparatura	61
4.	Metody	63
4.1.	Hodowle bakteryjne	63
4.2.	Izolacja plazmidowego DNA	63
4.3.	Izolacja chromosomalnego DNA	63
4.4.	Amplifikacja DNA w reakcji PCR.....	64
4.5.	Trawienie enzymami restrykcyjnymi.....	64
4.6.	Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym	65
4.7.	Elucja z żeli agarozowych.....	65
4.8.	Precypitacja DNA	65
4.9.	Łączenie fragmentów DNA.....	65
4.10.	Oczyszczanie produktów PCR.....	66
4.11.	Pomiar stężenia DNA i RNA	66
4.12.	Sekwencjonowanie fragmentów DNA.....	66
4.13.	Przygotowanie plazmidowego DNA do rekombinacji.....	66

4.14.	Transformacja szczepów <i>E. coli</i>	66
4.15.	Elektrotransformacja komórek <i>M. smegmatis</i>	67
4.16.	Elektrotransformacja komórek <i>M. tuberculosis</i>	68
4.17.	Konstrukcja wektora do homologicznej rekombinacji.....	68
4.18.	Otrzymywanie mutantów SCO i DCO	69
4.19.	Poszukiwanie mutantów SCO i DCO	70
4.20.	Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów typu DCO .	72
4.21.	Hybrydyzacja metodą Southern blot	73
4.22.	Globalna analiza transkryptomu.....	74
4.23.	Ilościowy PCR z odwrotną transkryptazą (qRT-PCR)	77
4.24.	Ocena wzrostu szczepów <i>M. smegmatis</i> na podłożu stałym zawierającym azotan sodu jako jedyne źródło azotu	79
4.25.	Ocena zdolności asymilacji różnych źródeł azotu przez szczepy <i>M. smegmatis</i>	79
4.26.	Ocena zdolności konwersji azotanów do azotynów oraz azotynów do amoniaku przez szczepy <i>M. smegmatis</i>	80
4.27.	Analiza cech fenotypowych szczepów <i>M. smegmatis</i> z wykorzystaniem systemu BIOLOG.....	81
4.28.	Konstrukcja plazmidów do nadprodukcji rekombinowanych białek	82
4.29.	Nadprodukcja, izolacja i oczyszczanie rekombinowanych białek	82
4.30.	Oznaczanie stężenia białka.....	84
4.31.	Jednokierunkowa elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	85
4.32.	Immunodetekcja metodą western blot.....	85
4.33.	Badanie oddziaływań między białkami metodą Pull-down	86
4.34.	Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowych mykobakterii ...	86
4.35.	Analiza oddziaływań białek z DNA metodą EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	87

4.36.	Monitorowanie wzrostu szczepów <i>Mycobacterium</i> – pomiar gęstości optycznej (OD ₆₀₀) oraz określenie liczby żywych komórek (CFU – ang. colony forming unit)	87
4.37.	Analiza wrażliwości mykobakterii na DETA-NO i menadion za pomocą techniki CFU	88
4.38.	Analiza wrażliwości mykobakterii na wybrane antybiotyki oraz inne związki testem kropkowym na podłożu stałym	88
4.39.	Analiza wrażliwości mykobakterii na wybrane antybiotyki oraz inne związki metodą Microplate Alamar Blue Assay	88
4.40.	Analiza statystyczna	89
5.	Wyniki	90
5.1.	Przygotowanie modeli genetycznych pozwalających na analizę niezbędności genów <i>rv0195</i> , <i>rv0260c</i> i <i>msmeg_0432</i> w komórkach mykobakterii	90
5.1.1.	Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej	90
5.1.2.	Konstrukcja ukierunkowanych mutantów	92
5.1.3.	Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów typu DCO .	94
5.2.	Przygotowanie systemów ekspresyjnych do nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanych białek <i>Msmeg_0432</i> i <i>Rv0260c</i>	96
5.2.1.	Przygotowanie wektorów ekspresyjnych zdolnych do nadprodukcji rekombinowanych białek <i>Msmeg_0432</i> i <i>Rv0260c</i>	96
5.2.2.	Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek <i>Msmeg_0432</i> , <i>Msmeg_5784</i> i <i>Rv0260c</i>	97
5.3.	Analiza uzyskanych poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białku SUMO-Rv0260c	99
5.4.	Analiza mutantu Δ <i>msmeg_0432</i> <i>M. smegmatis</i> z wykorzystaniem macierzy fenotypowych	100
5.5.	Globalna analiza transkryptomyczna mutantu Δ <i>msmeg_0432</i> oraz Δ <i>msmeg_5784</i> <i>M. smegmatis</i> w warunkach głodu azotowego	101

5.5.1.	Weryfikacja wyników sekwencjonowania RNA metodą qRT-PCR.....	104
5.6.	Badanie oddziaływania białek Msme _g _0432 i Msme _g _5784 z DNA techniką EMSA.....	106
5.7.	Badanie oddziaływania białek Msme _g _0432 i Msme _g _5784 metodą Pull-down	108
5.8.	Analiza wzrostu i przeżywalności mutantów Δ msme _g _0432 i Δ msme _g _5784 <i>M. smegmatis</i> w obecności azotanu i azotynu sodu.....	110
5.9.	Ocena zdolności szczepów Δ msme _g _0432 i Δ msme _g _5784 <i>M. smegmatis</i> do konwersji azotanów do azotynów oraz azotynów do amoniaku.....	112
5.10.	Analiza wzrostu i przeżywalności mutantów Δ msme _g _0432 i Δ msme _g _5784 <i>M. smegmatis</i> w podłożu Sautona z różnymi źródłami azotu.....	114
5.11.	Wstępna charakterystyka fenotypowa szczepu Δ rv0260c <i>M. tuberculosis</i>	118
5.11.1.	Ocena poziomu białka Rv0260c w szczepie dzikim oraz szczepach mutantach Δ rv0260c i Δ rv0260c-attB:: <i>phsp</i> rv0260c <i>M. tuberculosis</i>	118
5.11.2.	Analiza kinetyki wzrostu i przeżywalności szczepu Δ rv0260c <i>M. tuberculosis</i> w obecności reaktywnych form tlenu i azotu.....	119
5.11.3.	Porównanie wrażliwości szczepu Δ rv0260c <i>M. tuberculosis</i> oraz szczepu kontrolnego na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki.....	121
5.11.3.1.	Ocena wrażliwości szczepu Δ rv0260c <i>M. tuberculosis</i> na podłożu stałym testem kropkowym.....	121
5.11.3.2.	Ocena wrażliwości szczepu Δ rv0260c <i>M. tuberculosis</i> w podłożu płynnym metodą Microplate Alamar Blue Assay (MABA).....	123
5.12.	Wstępna charakterystyka fenotypowa szczepu Δ rv0195 <i>M. tuberculosis</i>	125
5.12.1.	Analiza kinetyki wzrostu i przeżywalności szczepu Δ rv0195 <i>M. tuberculosis</i> w obecności reaktywnych form tlenu i azotu.....	125
5.12.2.	Porównanie wrażliwości szczepu Δ rv0195 <i>M. tuberculosis</i> oraz szczepu kontrolnego na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki.....	127
5.12.2.1.	Ocena wrażliwości szczepu Δ rv0195 <i>M. tuberculosis</i> na podłożu stałym testem kropkowym.....	127
5.12.2.2.	Ocena wrażliwości szczepu Δ rv0195 <i>M. tuberculosis</i> w podłożu płynnym metodą MABA.....	129

6.	Dyskusja	131
7.	Wnioski	138
8.	Streszczenie	139
9.	Abstract	142
10.	Literatura	144

B. Wykaz stosowanych skrótów

AD	roztwór albuminy surowicy bydlęcej i glukozy
ADP	adenozyno-5'-difosforan
Amp ^R	oporność na ampicylinę
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATP-aza	adenozynotrifosfataza
AUC	wartość powierzchni pola pod wykresem
BSA	albumina surowicy bydlęcej
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
CFU	liczba jednostek tworzących kolonie (ang. <i>colony forming unit</i>)
cGMP	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
C _t	cykle progowe (ang. <i>copy treshold</i>)
Da (kDA)	Dalton (1000 Da)
DCO	podwójny krzyżowy rekombinant (ang. <i>double cross over recombinant</i>)
DEPC	pirowęglan dietylu
DETA-NO	addukt dietylenotriaminy i tlenku azotu
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNaza	deoksyrybonukleaza
dNTP	mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	sól sodowa kwasu etyleno-diamino-tetraoctowego
EMSA	test zmiany ruchliwości elektroforetycznej
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy
GDH	dehydrogenaza glutaminianowa
GS-GOGAT	syntetaza glutaminowa/syntaza glutaminianowa
HEX	heksachloro-fluoresceina
His	sześć histydyn
Hyg ^R	oporność na higromycynę
IPTG	izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd
Km ^R	oporność na kanamycynę
MABA	mikropłytkowy test przeżywalności komórek

MBP	białko wiążące maltozę
MCS	miejsce wielokrotnego klonowania (ang. <i>multiple cloning site</i>)
MIC	minimalne stężenie związku hamujące wzrost drobnoustrojów
mRNA	informacyjny RNA
NADH/NAD ⁺	forma zredukowana i utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADPH/NADP ⁺	forma zredukowana i utleniona fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
OADC	kwas oleinowy/albumina/dekstroza/katalaza
OD ₆₀₀	gęstość optyczna zawiesiny komórek bateryjnych badana z wykorzystaniem fali o długości $\lambda=600$ nm (ang. <i>optical density</i>)
PAN	Polska Akademia Nauk
PCR	łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
pz	liczba par zasad
qRT-PCR	ilościowy PCR z odwrotną transkryptazą
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RNA-Seq	sekwencjonowanie RNA
RNaza	rybonukleaza
rpm	obroty na minutę (ang. <i>revolutions per minute</i>)
SCO	pojedynczy krzyżowy rekombinant (ang. <i>single cross over recombinant</i>)
SDS	siarczan dodecyłu sodu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
sRNA	małe RNA (ang. <i>small RNA</i>)
SUMO	białko podobne do ubikwityny
TCS	dwukomponentowy system transdukcji sygnału
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
UV	promieniowanie ultrafioletowe
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -galaktopiranozyd

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Mycobacterium*

Rodzaj *Mycobacterium* (prątki) obejmuje obligatoryjne patogeny, gatunki oportunistyczne jak i saprofity. Drobnoustroje te należą do rodziny *Mycobacteriaceae*, rzędu *Actinomycetales* i klasy *Schizomycetes*. Obecnie wiadomo, że istnieje ponad 170 gatunków mykobakterii, zróżnicowanych pod względem genomu oraz chorobotwórczości, a do najgroźniejszych patogenów należą prątki wchodzące w skład *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium leprae* oraz *Mycobacterium ulcerans*. W ostatnich latach obserwuje się także zwiększoną częstość zakażeń prątkami niegruźliczymi wywołującymi choroby o szerokim zakresie objawów klinicznych zwane mykobakteriozami (Pfyffer i Palicova, 2011; Antczak i wsp., 2017; Forbes, 2017).

Prątki charakteryzują się pałeczkowatym kształtem, prostym lub delikatnie zakrzywionym, o wymiarach od 0,2 do 0,6 μm na 1,0 do 10 μm . Ściana komórkowa mykobakterii wykazuje strukturę charakterystyczną dla bakterii Gram-dodatnich, a jej unikalny skład zapewnia większą niż w przypadku innych drobnoustrojów oporność na związki, w tym liczne leki, kwasy i zasady. Bakterie te rosną w warunkach tlenowych, ale nie są zdolne do poruszania się lub tworzenia spor (za wyjątkiem *Mycobacterium marinum*). Kolonie tworzone przez prątki są gładkie lub szorstkie i różnią się kolorem w zależności od zdolności gatunku do wytwarzania karotenoidowych pigmentów. Wśród mykobakterii wyróżnia się nefotochromogeny (np. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*), czyli gatunki nie produkujące barwników, fotochromogeny (np. *M. marinum*, *Mycobacterium kansasii*), wytwarzające pigment w obecności światła oraz skotochromogeny (np. *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium flavescens*), zdolne wytworzyć barwnik zarówno po naświetlaniu jak i w ciemności. Ze względu na tempo wzrostu prątki dzielą się na wolno (np. *M. tuberculosis*) oraz szybko rosnące (np. *Mycobacterium smegmatis*). Przyjmuje się, że szybko rosnący gatunek jest zdolny w optymalnych warunkach do utworzenia kolonii na podłożu stałym w mniej niż siedem dni (Traag i wsp., 2010; Pfyffer i Palicova, 2011).

Modelem badawczym niniejszej pracy jest *M. tuberculosis*, czynnik etiologiczny gruźlicy oraz *M. smegmatis*, szybko rosnący gatunek saprofityczny o zbliżonej morfologii.

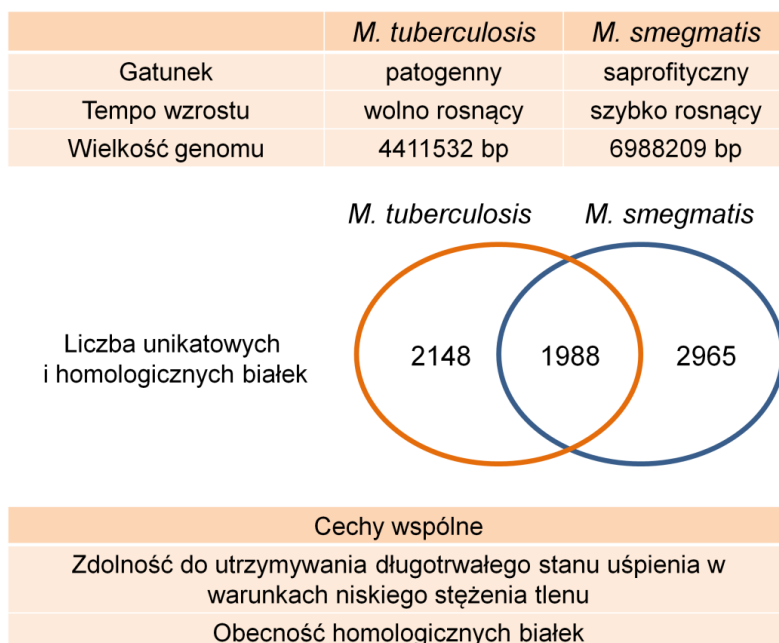


Figura 1. Porównanie *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* (na podstawie danych literaturowych Akinola i wsp., 2013).

1.2. Regulacja ekspresji genów

Ekspresja genów jest kluczowym mechanizmem umożliwiającym ujawnienie fenotypu zapisanego w informacji genetycznej, jak również determinującym przetrwanie i przystosowanie się bakterii do warunków środowiska. Reakcja na zmiany zależy od regulacji na poziomie transkrypcji i translacji, w którą zaangażowane są transportery, mechanizmy transdukcji sygnału oraz szereg białek, enzymów czy metabolitów indukujących odpowiedź komórki. Istotną rolę w tej regulacji pełnią czynniki transkrypcyjne zarówno globalne jak i lokalne oraz ich wzajemne relacje (Klumpp i Hwa, 2014; Opechowska i Bielecki, 2014).

1.2.1. Regulacja ekspresji genów z udziałem czynników transkrypcyjnych

Geny bakteryjne zgrupowane są w operonach, w których są wspólnie transkrybowane i regulowane. W obrębie pojedynczego operonu znajduje się sekwencja promotorowa rozpoznawana przez polimerazę RNA, operator będący miejscem wiązania się aktywatora lub represora oraz terminator stanowiący region, w którym następuje zakończenie transkrypcji. Regulacja ekspresji genów jest możliwa dzięki interakcji elementów *cis* i *trans*, gdzie *cis* to odcinki DNA pełniące funkcje regulatorowe, a *trans* to czynniki zdolne do związania tego DNA (Balleza i wsp., 2009). Regulatory transkrypcji zawierają w swojej budowie domenę

sensorową wiążącą ligand lub oddziałującą z innym białkiem, jak również domenę wiążącą DNA, za pomocą której wpływają na ekspresję genów promując bądź hamując proces transkrypcji (Rivera-Gomez i wsp., 2017). Regulacja pozytywna transkrypcji polega na jej inicjacji w wyniku wiązania się czynnika do sekwencji promotorowej i rekrutacji polimerazy RNA. W regulacji negatywnej natomiast, wiązanie regulatora skutkuje zahamowaniem aktywności polimerazy i zatrzymaniem syntezy mRNA (Balleza i wsp., 2009).

Biorąc pod uwagę liczbę regulowanych genów, różne typy rozpoznawanych promotorów, warunki w których sprawują kontrolę czy też interakcje z innymi regulatorami, czynniki transkrypcyjne można podzielić na globalne i lokalne. Najlepiej poznanymi mikroorganizmami pod względem regulacji ekspresji genów są bakterie *E. coli*, u których zidentyfikowano siedem globalnych białek regulatorowych: ArcA, CRP, Fis, FNR, H-NS, IHF oraz Lrp, wpływających bezpośrednio na ekspresję 51% wszystkich genów (Martinez-Antonio i Collado-Vides, 2003). Zmiany poziomów transkryptów wynikają często ze współregulacji globalnego czynnika transkrypcyjnego z lokalnym, czego przykładem jest interakcja CRP z aktywatorem MelR prowadząca do inicjacji transkrypcji operonu melibiozy *melAB* (Belyaeva i wsp., 2000). Stężenia lokalnych regulatorów są zazwyczaj na niskim poziomie a miejsca przez nie rozpoznawane charakteryzują się wysokim powinowactwem, podczas gdy ilość globalnych czynników pozostaje na wysokim poziomie ze względu na niską specyficzną wiązania (Balleza i wsp., 2009). W określonych warunkach różne globalne regulatory mogą wpływać na ekspresję tego samego genu, tak jak np. FNR i IHF aktywują promotor *narG* (Schroder i wsp., 1993). Regulacja ekspresji genów obejmuje także współpracę między globalnymi białkami regulatorowymi a specyficznymi czynnikami sigma (σ). W zależności od genu, jeden regulator jest w stanie zaangażować w transkrypcję różne typy czynników σ . U bakterii bardzo ważną funkcję pełnią czynniki σ^{70} , które uczestniczą głównie w transkrypcji konstytutywnych genów odpowiedzialnych za utrzymanie podstawowych procesów komórkowych (Martinez-Antonio i Collado-Vides, 2003; Bush i Dixon, 2012; Paget, 2015).

Szczególną rolę w regulacji ekspresji genów pełnią systemy transdukcji sygnału opierające się na interakcji białek sensorowych z czynnikami transkrypcyjnymi. Determinują one zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za przystosowanie się komórki do warunków środowiska, jak również genów zaangażowanych w podstawowe procesy życiowe, wirulencję czy patogenezę, dlatego też stanowią ważny element fizjologii bakterii (Parish, 2014).

1.3. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCS)

W adaptacji niemal wszystkich bakterii do warunków środowiska, kluczową rolę odgrywają TCS. Są one zbudowane z kinazy histydynowej aktywowanej środowiskowymi bodźcami oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego kontrolującego transkrypcję genów. Zewnątrzkomórkowe sygnały prowadzą do autofosforylacji reszty histydynowej kinazy, a następnie przeniesienia reszty fosforanowej na białko regulatorowe, które w ten sposób zaktywowane, ulega zmianom konformacji umożliwiającym oddziaływanie z DNA (Stock i wsp., 2000).

1.3.1. Kinaza histydynowa

Kinaza histydynowa jest białkiem zazwyczaj zakotwiczonym w błonie komórkowej bakterii i wykazuje wrażliwość wobec różnorodnych czynników środowiskowych m.in. temperatury, światła, dostępności tlenu, pH czy stanu oksydacyjno-redukcyjnego (Parish, 2014). W królestwie bakterii obecne są setki genów kodujących kinazy histydynowe. Występują one znacznie częściej u tej grupy mikroorganizmów aniżeli u archeonów czy organizmów eukariotycznych, dlatego też uważa się, że geny te miały swój początek u bakterii (Koretke i wsp., 2000).

W strukturze kinazy histydynowej można wyróżnić domenę odbierającą sygnały i dwie wysoce konserwatywne domeny tworzące rdzeń, domenę katalityczną wiążącą ATP oraz domenę dimeryzacyjną. Białka te funkcjonują jako dimery, w których każdy z monomerów fosforyluje resztę histydyny drugiego monomeru. Zewnętrzny bodziec odbierany przez domenę rozpoznającą sygnały inicjuje wiązanie ATP, co prowadzi do autofosforylacji konserwatywnej reszty histydyny w wewnątrzkomórkowej domenie dimeryzacyjnej, pełniącej także funkcję fosfotransferazy (Wolanin i wsp., 2002). Większość prokariotycznych kinaz przekazuje resztę fosforanową z reszty histydynowej na asparaginian znajdujący się w domenie białka regulatorowego, które aktywowane w ten sposób przeprowadza zmiany w komórce. Geny kodujące kinazy histydynowe i białka regulatorowe w tego rodzaju dwukomponentowych systemach, zwykle znajdują się w obrębie jednego operonu. U eukariontów natomiast, znacznie częściej występują kinazy „hybrydowe”, posiadające w swojej strukturze wewnątrzcząsteczkowe domeny ulegające fosforylacji, natomiast przeniesienie reszty fosforanowej na białko regulatorowe odbywa się przy udziale fosfotransferazy histydyny (Capra i Laub, 2012).

Kinazy histydynowe w swojej budowie posiadają od jednej do trzynastu domen transbłonowych połączonych z wewnątrzkomórkowymi domenami, katalityczną oraz

dimeryzacyjną. Pomiędzy dwiema ostatnimi a transmembranowymi elementami kinazy mogą występować dodatkowe domeny takie jak Per-Arnt-Sim, fosfodiestraza cGMP, cyklazy adenylowe czy fosfatazy. Są one zdolne do przekazywania sygnałów z przestrzeni peryplazmatycznej do rdzenia kinazy oraz do bezpośredniego rozpoznawania bodźców z cytoplazmy (Capra i Laub, 2012).

1.3.2. Białka regulatorowe

Regulatory odpowiedzi są cytoplazmatycznymi partnerami kinaz histydynowych. Podstawową i czasem jedyną domeną białka regulatorowego jest wysoce konserwatywna domena odbierająca sygnał, katalizująca przejście reszty fosforanowej z partnerskiej kinazy. W przypadku regulatorów składających się wyłącznie z takiej domeny, uzyskanie sygnału skutkuje zmianą konformacji i odpowiedzią na bodziec, jednakże większość białek regulatorowych prócz podstawowej domeny zawiera także domenę wiążącą DNA. Dla tej grupy regulatorów transfer reszty fosforanowej stymuluje homodimeryzację domeny odbierającej sygnał, umożliwiającą związanie się białka do DNA i przeprowadzenie zmian transkrypcyjnych. Inne powszechnie występujące domeny to domena posiadająca właściwości ATPazy w połączeniu z domeną wiążącą DNA, domena będąca cyklazą diguanylową czy domena o funkcji metylotransferazy CheB. Znacznie rzadziej występują domeny wiążące białka bądź RNA (Galperin, 2006).

1.3.3. Ewolucja ścieżek sygnałowych

Źródłem nowych kinaz oraz białek regulatorowych tworzących TCS jest horyzontalny transfer genów lub duplikacja genów. Przeniesienie informacji genetycznej z jednego organizmu do drugiego skutkuje najczęściej zachowaniem pierwotnej funkcjonalności kinaz, za którą odpowiedzialna jest domena rozpoznająca sygnał. Pozyskanie zdolności do rozpoznawania nowych bodźców jest natomiast efektem zmian w strukturze domeny sensorowej poprzez tasowanie domen lub nagromadzenie mutacji w jej obrębie (Alm i wsp., 2006). Podobnie w przypadku regulatorów, przyczyną zróżnicowania genetycznego i odmiennej odpowiedzi na sygnał mogą być drobne modyfikacje w obrębie domen bądź ich przetasowanie (Perez i Groisman, 2009).

1.3.4. TCS zaangażowane w przeżywalność bakterii

Większość TCS jest zaangażowana w odpowiedź komórki na stres środowiskowy, aczkolwiek zaobserwowano, że istnieją także systemy odpowiedzialne za utrzymanie funkcji

życiowych bakterii, często kluczowe dla przeżycia komórki. Pierwszym odkrytym TCS niezbędnym do przeprowadzenia cyklu komórkowego u *Caulobacter crescentus* był system PleC-DivK oraz opisany rok później system CckA-CtrA (Hecht i wsp., 1995; Quon i wsp., 1996). Kolejnymi dobrze scharakteryzowanymi systemami zaangażowanymi w podział komórki były MtrAB u *M. tuberculosis*, YycFG u *Staphylococcus aureus* i PdhS u *Brucella abortus* (Zahrt i Deretic, 2000; Dubrac i Msadek, 2004; Hallez i wsp., 2007). Zidentyfikowano także kilka fakultatywnych TCS zaangażowanych w utrzymanie integralności błony komórkowej narażonej na stres np. Cpx u *Escherichia coli*, CesSR u *Lactococcus lactis* i MprB u *M. tuberculosis*, oraz systemy regulujące adaptacje ściany komórkowej do warunków stresowych takie jak CesRK u *Listeria monocytogenes*, VraSR u *S. aureus* i WigKR u *Vibrio cholerae* (Pogliano i wsp., 1997; Martinez i wsp., 2007; Gottschalk i wsp., 2008; Muthaiyan i wsp., 2008; Bretl i wsp., 2014; Dorr i wsp., 2016).

1.3.5. TCS u mykobakterii

Genom *M. tuberculosis* zawiera geny kodujące około dwustu białek regulatorowych, z czego mniej więcej połowę stanowią hipotetyczne czynniki transkrypcyjne, jeden niepowiązany i jedenaście powiązanych genetycznie TCS oraz przynajmniej pięć „sierocych” białek regulatorowych zaangażowanych w transdukcję sygnału (Cole i wsp., 1998; Marszałek i wsp., 2014). Porównawcze analizy genomowe wykazały współistnienie homologów prawie wszystkich TCS zidentyfikowanych u prątków gruźlicy także u innych gatunków *Mycobacterium*, w tym u szybko rosnącego *M. smegmatis* (Zahrt i Deretic, 2001).

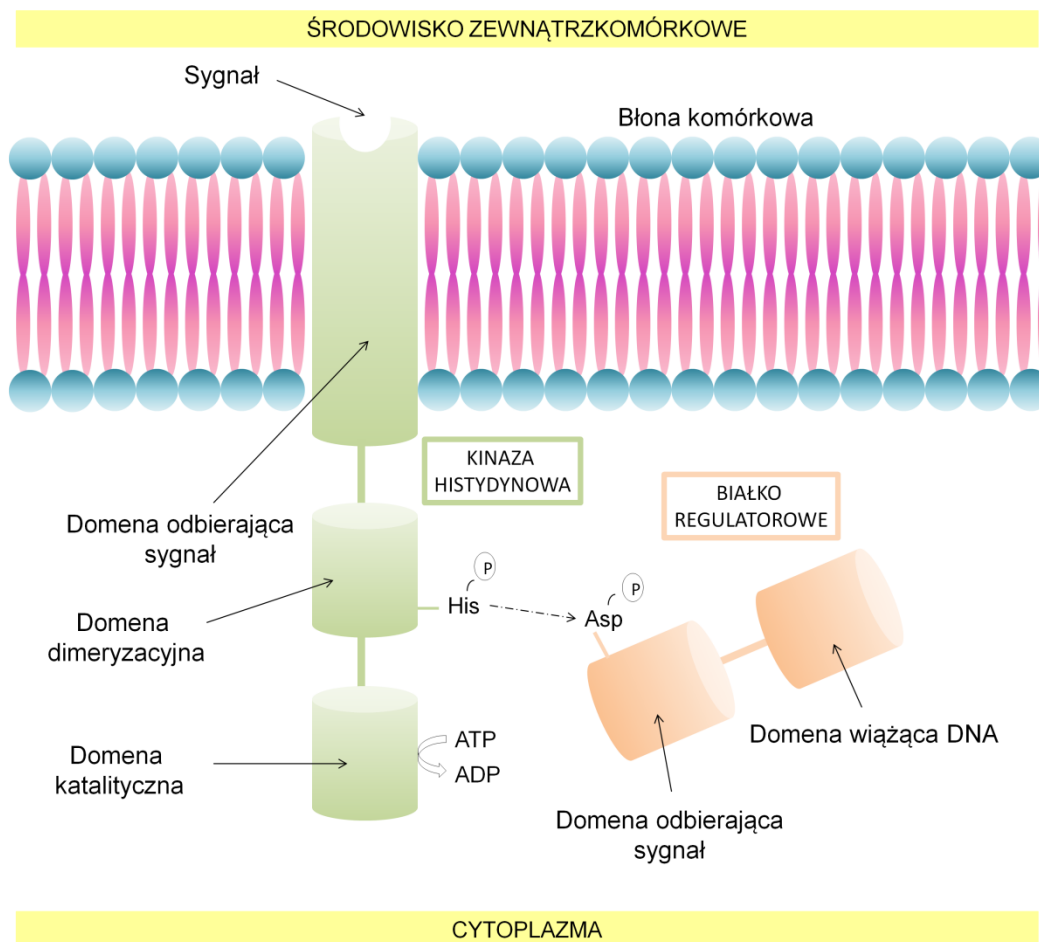


Figura 2. Schemat prokariotycznego TCS.

1.3.5.1. SenX3 – RegX3 (Rv0490 – Rv0491)

Pierwszym opisanym TCS u *M. tuberculosis* był system SenX3 – RegX3 składający się z kinazy SenX3 i białka regulatorowego RegX3, regulujący ekspresję ponad stu genów zaangażowanych między innymi w metabolizm energetyczny oraz utrzymanie integralności ściany komórkowej. Badania wykazały, że mutant *M. tuberculosis* zawierający delecję w obrębie genów kodujących ten TCS, charakteryzuje się osłabionym wzrostem w makrofagach i podczas infekcji myszy (Parish i wsp., 2003). Zaobserwowano także, że aktywacja systemu SenX3-RegX3 zarówno u *M. tuberculosis* jak i *M. smegmatis* zachodzi w odpowiedzi na niskie stężenie nieorganicznego fosforanu (Glover i wsp., 2007; Tischler i wsp., 2013).

1.3.5.2. Rv0600c – Rv0601c – Rv0602c

System Rv0600c – Rv0601c – Rv0602c jest unikalny ze względu na swoją strukturę oraz występowanie jedynie w grupie prątków należących do *Mycobacterium tuberculosis* complex. Obecnie nieznane są bodźce aktywujące ten TCS oraz mechanizmy przez niego kontrolowane, natomiast wiadomo, że geny *rv0600c* i *rv0601c* kodują dwie funkcjonalnie zróżnicowane domeny tworzące kinazę, podczas gdy *rv0602c* koduje białko regulatorowe (Shrivastava i wsp., 2006).

1.3.5.3. PhoP – PhoR (Rv0757 – Rv0758)

Kinaza PhoR oraz białko regulatorowe PhoP stanowią system regulujący ponad sto pięćdziesiąt genów zaangażowanych w system sekrecji ESX-1, oddychanie, syntezę lipidów związanych z wirulencją oraz ogólne procesy metaboliczne (Walters i wsp., 2006; Frigui i wsp., 2008; Gonzalo-Asensio i wsp., 2008). W wielu badaniach wykazano, że pozbawienie *M. tuberculosis* funkcjonalnego systemu PhoP – PhoR skutkuje znaczącą atenuacją prątków gruźlicy. Osłabiony wzrost zmutowanych komórek obserwowano w ludzkich i mysich makrofagach oraz podczas infekcji myszy i świnek morskich (Martin i wsp., 2006; Walters i wsp., 2006; Aguilar i wsp., 2007). Sygnał środowiskowy aktywujący ten system nie został do tej pory zidentyfikowany, jednakże odnotowano zwiększenie ekspresji genu *phoP* po ekspozycji bakterii na żelazo (Manabe i wsp., 1999).

1.3.5.4. NarL – NarS (Rv0844c – Rv0845)

Rolą białka regulatorowego NarL oraz kinazy histydynowej NarS u *M. tuberculosis* jest regulacja metabolizmu związków azotowych. Pozbawienie szczepu dzikiego funkcjonalnego systemu nie wpływa na przeżywalność patogenu w makrofagach oraz na jego zjadliwość u myszy (Parish i wsp., 2003). Podczas obecności azotanu w środowisku regulator NarL wpływa na ekspresję 30 genów, z czego ponad połowa podlega regulacji zależnej od białka DevR, będącego elementem innego systemu transdukcji sygnału. Zaobserwowano, że wiązanie NarL do promotorów genów *narK2*, *acg* oraz *rv3130c* jest możliwe w obecności ufosforylowanego białka DevR, sugerując działanie tych białek w komórce jako heterodimer współregulujący ekspresję wyżej wymienionych genów. Uważa się, że sygnałem aktywującym oba systemy jest azotyn będący produktem konwersji azotanu (Malhotra i wsp., 2015).

1.3.5.5. PrrA – PrrB (Rv0903c – Rv0902c)

Badania nad system PrrA – PrrB u *M. tuberculosis* wykazały, że geny kodujące białko regulatorowe PrrA oraz kinazę histydynową PrrB są niezbędne do przeżycia drobnoustroju, a ich ekspresja jest indukowana podczas wzrostu bakterii w makrofagach, jak również w warunkach ograniczonego dostępu azotu (Graham i Clark-Curtiss, 1999; Haydel i wsp., 2012). Komórki mutantów transpozonowych, w których białko PrrA jest niekompletne, charakteryzują się osłabionym wzrostem na wczesnych etapach infekcji w mysich makrofagach i wydają się powracać do fenotypu dzikiego po około tygodniu od zakażenia (Ewann i wsp., 2002).

1.3.5.6. MprA – MprB (Rv0981 – Rv0982)

MprA – MprB jest systemem zaangażowanym w utrzymanie przewlekłej infekcji *M. tuberculosis* (Zahrt i Deretic, 2001). Kinaza MprB w tym układzie stanowi jednocześnie fosfatazę monitorującą w komórce stężenie fosforylowanego białka regulatorowego MprA. Analizy porównawcze między zmutowanym i dzikim szczepem wykazały, że w warunkach fizjologicznych białko MprA reguluje ekspresję 141 genów związanych między innymi z wirulencją, ścianą komórkową, detoksyfikacją, metabolizmem lipidów oraz oddychaniem. Wśród regulowanych genów znajdują się także dwa czynniki sigma *sigB* oraz *sigE*, istotne w odpowiedzi komórki na stres oraz kontrolujące własne rozległe regulony (He i wsp., 2006). Kolejne badania wykazały, że system MprA – MprB reguluje operon *espA* modulując system sekrecji ESX-1 odpowiedzialny za uwalnianie immunomodulujących białek biorących udział w patogenezie oraz interakcji patogenu z gospodarzem (Pang i wsp., 2013).

1.3.5.7. KdpD – KdpE (Rv1028c – Rv1027c)

System KdpD – KdpE tworzy kinaza KdpD o nietypowej strukturze zawierającej duże domeny cytoplazmatyczne oraz białko regulatorowe KdpE. Ze względu na budowę przypuszcza się, że kinaza ta jest wrażliwa na zmiany osmotyczne w cytoplazmie. Badania potwierdziły, że system ten ulega indukcji podczas głodu komórki i odgrywa rolę w regulacji homeostazy potasu oraz wirulencji *M. tuberculosis*. Przeprowadzone doświadczenia z wykorzystaniem ludzkich makrofagów infekowanych prątkami w warunkach *in vitro* wykazały zmiany w ekspresji genów kodujących ten TCS, natomiast myszy zainfekowane mutantem posiadającym delecję w obrębie tych genów, charakteryzowały się krótszym przeżyciem (Betts i wsp., 2002; Steyn i wsp., 2003; Haydel i Clark-Curtiss, 2004; Freeman i wsp., 2013; Parish, 2014).

1.3.5.8. TrcR – TrcS (Rv1033c – Rv1032c)

Na temat systemu TrcR – TrcS nie ma jednoznacznych informacji. Wiadomo, że system ten ulega ekspresji u *M. tuberculosis* na wczesnych etapach infekcji makrofagów oraz w hodowli płynnej, jednakże pojawiają się sprzeczne informacje na temat roli tego systemu w zjadliwości prątków (Haydel i wsp., 2002). Podczas gdy mutant transpozonowy *trcS:Tn* *M. tuberculosis* MT103 przejawia fenotyp szczepu dzikiego w czasie infekcji myszy C57BL/6, mutant Δ *trcS* *M. tuberculosis* H37Rv wykazuje zwiększoną w stosunku do szczepu dzikiego zjadliwość wobec myszy DBA/2 (Ewann i wsp., 2002; Parish i wsp., 2003). Inne analizy ujawniły, że pozbawienie prątków funkcjonalnej kinazy TrcS wpływa na zmiany w ekspresji 50 genów, z czego większość koduje hipotetyczne białka (Wernisch i wsp., 2003).

1.3.5.9. DosR – DosS – DosT (Rv3133c – Rv3132c – Rv2027c)

Nietypowym TCS u *M. tuberculosis* jest system DosR – DosS – DosT w skład, którego wchodzi dwie kinazy DosS i DosT oraz białko regulatorowe DosR. Ze względu na lokalizację w genomie transkrypcja genów *dosR* i *dosS* jest sprzężona, natomiast gen *dosT* jest oddalony od pozostałych składników systemu (Dasgupta i wsp., 2000). Badania wskazują, że system ten ulega indukcji w warunkach niedoboru tlenu oraz po ekspozycji na tlenek azotu i tlenek węgla (Sherman i wsp., 2001; Voskuil i wsp., 2003; Kumar i wsp., 2008). Zwiększoną ekspresję genów kodujących ten system obserwuje się także po infekcji ludzkich monocytów, mysich makrofagów oraz po zakażeniu myszy i świnek morskich, co sugeruje rolę tego systemu w patogenezie (Dasgupta i wsp., 2000; Schnappinger i wsp., 2003; Sharma i wsp., 2006; Gautam i wsp., 2015).

1.3.5.10. MtrA – MtrB (Rv3246c – Rv3245c)

Niezbędnym do przeżycia *M. tuberculosis* jest system MtrA – MtrB zaangażowany w replikację oraz utrzymanie integralności ściany komórkowej (Haydel i Clark-Curtiss, 2004; Purushotham i wsp., 2015). Doniesienia literaturowe sugerują rolę tego systemu także w zjadliwości prątków, choć ze względu na brak możliwości uzyskania ukierunkowanego mutantu, nie można tego jednoznacznie stwierdzić. Wiadomo, że mutant transpozonowy *mtrB:Tn* *M. avium* nie jest w stanie przeżyć w ludzkich komórkach mielomonocytów THP-1, natomiast nadekspresja białka regulatorowego MtrA u *M. tuberculosis* wpływa na osłabienie wzrostu patogenu zarówno w warunkach *in vitro* w makrofagach jak i *in vivo* u myszy C57BL/6 (Cangelosi i wsp., 2006; Fol i wsp., 2006).

1.3.5.11. TcrX – TcrY (Rv3765c – Rv3764c)

Do tej pory bardzo słabo opisany jest system składający się z kinazy TcrY oraz białka regulatorowego TcrX. Zaobserwowano jedynie, że mutant *M. tuberculosis* pozbawiony funkcjonalnego systemu TcrXY charakteryzuje się większą niż szczep dziki zjadliwością u myszy. Wciąż jednak nieznane są warunki, w których system ten ulegałby ekspresji, jak również bodźce aktywujące ścieżki sygnałowe (Parish i wsp., 2003).

1.3.5.12. PdtaR – PdtaS (Rv1626 – Rv3220c)

Kinaza PdtaS i białko regulatorowe PdtaR stanowi szczególny system u *M. tuberculosis* ze względu na różną lokalizację genów kodujących składniki tej ścieżki. Badania wykazały, że kinaza PdtaS fosforyluje białko PdtaR, ale nie jest zdolna do przeniesienia fosforanu na takie białka regulatorowe jak PrrA, NarL czy RegX3 (Morth i wsp., 2005). Z najnowszych doniesień literaturowych wynika, że pozbawienie *M. smegmatis* kinazy PdtaS skutkuje zwiększeniem wrażliwości prątków na antybiotyki aminoglikozydowe, zakłócające syntezę białek poprzez wiązanie się do rybosomów (Dadura i wsp., 2017). Regulator PdtaR natomiast nie jest typowym czynnikiem transkrypcyjnym. Białko to nie wiąże się do DNA a działa jako antyterminator transkrypcji (Morth i wsp., 2004). Co więcej, w badaniach przesiewowych, w oparciu o mutagenezę transpozonową wykazano, że gen *pdtaR* jest niezbędny u *M. tuberculosis* do wzrostu w warunkach *in vitro* (Sasseti i wsp., 2003).

TCS	Obecność u <i>M. tuberculosis</i>	Obecność u <i>M. smegmatis</i>	Przypuszczalna funkcja	Referencje
SenX-RegX3	+	+	Udział w wirulencji i utrzymaniu integralności ściany komórkowej	Bertl i wsp., 2011; Parish i wsp., 2003
Rv0600c-Rv0601c-Rv0602c	+	-	Nieznana	Bertl i wsp., 2011
PhoP-PhoR	+	+	Udział w wirulencji, metabolizmie ogólnym oraz systemie sekrecji ESX-1	Bertl i wsp., 2011; Frigui i wsp., 2008; Gonzalo-Asensio i wsp., 2008; Walters i wsp., 2006; Aguilar i wsp., 2007; Martin i wsp., 2006
NarL-NarS	+	+	Udział w metabolizmie związków azotowych	Bertl i wsp., 2011; Malhotra i wsp., 2015
PrrA-PrrB	+	+	Udział w wirulencji	Bertl i wsp., 2011; Ewann i wsp., 2002
MprA-MprB	+	+	Udział w wirulencji, detoksyfikacji, oddychaniu, systemie sekrecji ESX-1 oraz metabolizmie lipidów	Bertl i wsp., 2011; Zahrt i Deretic, 2001; He i wsp., 2006; Pang i wsp., 2013
KdpD-KdpE	+	+	Udział w wirulencji i utrzymaniu homeostazy potasu	Bertl i wsp., 2011; Steyn i wsp., 2003; Freeman i wsp., 2013; Parish i wsp., 2003
TrcR-TrcS	+	+	Udział w wirulencji	Bertl i wsp., 2011; Ewann i wsp., 2002
DosR-DosS-DosT	+	+	Udział w wirulencji oraz adaptacji do warunków beztlenowych, tlenu azotu i tlenu węgla	Bertl i wsp., 2011; Sherman i wsp., 2001; Voskuil i wsp., 2003; Kumar i wsp., 2008; Gautam i wsp., 2015
MtrA-MtrB	+	+	Udział w wirulencji, replikacji oraz utrzymaniu integralności ściany komórkowej	Bertl i wsp., 2011; Purushotham i wsp., 2015; Fol i wsp., 2006; Cangelosi i wsp., 2006
TcrX-TcrY	+	+	Udział w wirulencji	Bertl i wsp., 2011; Parish i wsp., 2003
PdtaR-PdtaS	+	+	Udział w oporności na antybiotyki aminoglikozydowe	Bertl i wsp., 2011; Dadura i wsp., 2017

Figura 3. Znaczenie mykobakteryjnych TCS w fizjologii i patogenezie.

1.3.6. Inne „sieroce” kinazy i białka regulatorowe

Oprócz kinaz i regulatorów wchodzących w skład wyżej opisanych systemów, w komórkach mykobakterii istnieją również tak zwane „sieroce” białka. W tym przypadku gen kodujący kinazę bądź regulator, nie występuje w operonie wraz z genem kodującym białko partnerskie uczestniczące w przekazywaniu sygnału. Można zatem stwierdzić, że system PdtaR – PdtaS tworzą oddziałujące ze sobą „sieroce” białka. W genomie prątków zapisana jest informacja genetyczna dotycząca jeszcze przynajmniej pięciu „sierocych” regulatorów, dla których nie udało się dotąd zidentyfikować partnerskich kinaz. Należą do nich białka Rv0195 (brak u *M. smegmatis*), Rv0260c (Msmeg_0432 u *M. smegmatis*), Rv0818 (Msmeg_5784 u *M. smegmatis*), Rv2884 (brak u *M. smegmatis*) oraz Rv3143 (Msmeg_2064). Brak w literaturze informacji na temat jakiegokolwiek funkcji regulatorów Rv2884 oraz Rv3143, natomiast można odnaleźć raporty dotyczące pozostałych czynników transkrypcyjnych (Bretl i wsp., 2011).

1.3.6.1. Rv0195

Białko regulatorowe Rv0195 występuje w komórkach *M. tuberculosis*, natomiast brak go u szybko rosnących prątków *M. smegmatis*. Zaobserwowano, że pozbawienie prątków

gruźlicy funkcjonalnego genu *rv0195* nie wpływa na tempo wzrostu bakterii w warunkach tlenowych, ale znacząco obniża przeżywalność w warunkach stresu oksydacyjnego oraz zaburza procesy wybudzania ze stanu uśpienia w warunkach beztlenowych. Wykazano także zmniejszenie zjadliwości szczepu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* w ludzkich komórkach mielomonocytów THP-1 jak i u myszy C57BL/6. Istotną rolę tego czynnika transkrypcyjnego w adaptacji bakterii do środowiska podkreśla fakt, że w warunkach beztlenowych białko Rv0195 reguluje ekspresję ponad 180 genów (Fang i wsp., 2013).

1.3.6.2. Rv0260c (Msmeg_0432) – NnaR

Dokładna funkcja białka NnaR u *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* nie jest znana, wiadomo natomiast, że u obu gatunków białko to ulega indukcji podczas głodu azotowego. Przeprowadzone badania wykazały, że ekspresja NnaR jest zależna od globalnego regulatora metabolizmu azotu jakim jest białko GlnR (Jenkins i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015). Doświadczenia na mutancie *nnaR::Tn5062 Streptomyces coelicolor* ujawniły, że u tych promieniowców homologiczne białko NnaR reguluje proces asymilacji azotanów i azotynów (Amin i wsp., 2012).

1.3.6.3. Rv0818 (Msmeg_5784) – GlnR

Jak już wspomniano, białko GlnR stanowi jeden z ważniejszych regulatorów u bakterii. U promieniowców GlnR jest znany jako czynnik transkrypcyjny kontrolujący transport niektórych źródeł węgla oraz regulujący metabolizm azotu (Liao i wsp., 2015). Dowiedziono, że w warunkach głodu azotowego GlnR kontroluje ekspresję przynajmniej 33 genów u *M. tuberculosis* oraz ponad 100 genów u *M. smegmatis*. Podczas infekcji, GlnR warunkuje wewnątrzkomórkowe przeżycie prątków gruźlicy regulując geny, których produkty są zaangażowane w detoksykację tlenku azotu, redukcję azotanów i azotynów, a także transport oraz metabolizm ornityny i asparaginy. U szczepu saprofitycznego natomiast, w warunkach ograniczonego dostępu azotu, włączane są geny umożliwiające asymilację azotu z szerokiej gamy różnorodnych źródeł środowiskowych (Jenkins i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015). Analizy wzrostu w hodowlach płynnych wykazały, że obecność GlnR u *M. smegmatis* warunkuje przyswajanie azotu pochodzącego z alaniny, histydyny, proliny, seryny, etanoloaminy, azotanu potasu, azotynu sodu i kwasu moczowego (Jessberger i wsp., 2013).

1.4. Metabolizm azotu u bakterii

Azot jest niezbędnym do wzrostu mikroorganizmów pierwiastkiem oraz ważnym elementem biologicznych makrocząsteczek takich jak kwasy nukleinowe, białka czy ściana komórkowa. Preferowanym źródłem azotu większości bakterii są jony amonowe, które wewnątrz komórki włączane są w biosyntezę glutaminy lub glutaminianu, w zależności od dostępności jonów w środowisku. Ponadto istnieje wiele mechanizmów pozwalających pozyskać azot z alternatywnych źródeł, między innymi z aminokwasów, nukleotydów, peptydów czy azotanów. Obecność tych szlaków jest kluczowa dla przetrwania bakterii, kiedy te znajdują się w otoczeniu ubogim w jony amonowe (Merrick i Edwards, 1995; Amon i wsp., 2009; Williams i wsp., 2015; Garai i wsp., 2017).

1.4.1. Transport jonów amonowych

We wprowadzeniu amonu do komórki uczestniczą białka transmembranowe należące do rodziny Amt i są one obecne u niemal wszystkich bakterii (Andrade i Einsle, 2007). Genom *M. smegmatis* zawiera trzy geny kodujące białka należące do tej grupy (AmtA – *msmeg_4635*; AmtB – *msmeg_2425*; Amt1 – *msmeg_6259*) natomiast *M. tuberculosis* tylko jeden (AmtB – *rv2920c*) (Jenkins i wsp., 2013; Gouzy i wsp., 2014). W sąsiedztwie genu *amtB* u obu gatunków znajdują się geny kodujące białka GlnK (P_{II}) i GlnD biorące udział w regulacji pobierania jonów amonu przez kanał AmtB, co szczegółowo zostało opisane u *E. coli* (Williams i wsp., 2013). W odpowiedzi na wysokie stężenie wewnątrzkomórkowego azotu, rozpuszczalne trimeryczne białko GlnK bezpośrednio wiąże trimer AmtB tworząc kompleks niezdolny do przetransportowania amonu. Zdolność GlnK do blokowania transbłonowego kanału u enterobakterii jest regulowana poprzez urydylację i deurydylację przez transferazę urydylową GlnD w obecności ATP (Gruswitz i wsp., 2007). U promieniowców *S. coelicolor*, *Corynebacterium glutamicum*, *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* nie udowodniono do tej pory urydylacji i deurydylacji białka GlnK, natomiast potwierdzono adenylację i deadenylację przez białko GlnD funkcjonujące u tych bakterii jako transferaza adenylowa (Hesketh i wsp., 2002; Strosser i wsp., 2004; Williams i wsp., 2013).

U *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* geny kodujące kanały transportujące amon są pod kontrolą globalnego regulatora metabolizmu azotu GlnR i ulegają indukcji podczas głodu azotowego, podobnie jak u *S. coelicolor*, lecz inaczej niż u promieniowców *C. glutamicum* gdzie są regulowane przez drugi, mniej poznany regulator AmtR, niezależnie od obecności

azotu (Fink i wsp., 2002; Buchinger i wsp., 2009; Jessberger i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015).

1.4.2. Alternatywne źródła azotu

Jak już wspomniano *M. tuberculosis* posiada ograniczone zdolności pozyskiwania azotu z alternatywnych źródeł. Są one determinowane przez geny indukowane podczas głodu azotowego i umożliwiają metabolizm azotanów i azotynów (*rv0252-0253*, *rv0261*, *rv0267*, *rv2329c*), asparaginy (*rv0346*), ornityny (*rv2321c*, *rv2322c*) i mocznika (*rv1848-1850*), (Williams i wsp., 2015). U środowiskowego gatunku *M. smegmatis* występuje znacznie więcej genów pozwalających przyswoić azot pochodzący między innymi z aminokwasów i peptydów (*msmeg_0781*, *msmeg_1052*, *msmeg_2184*, *msmeg_2522*, *msmeg_2524*, *msmeg_6735*), puryn i pirymidyn (*msmeg_1293*, *msmeg_2748*, *msmeg_4011*, *msmeg_5730*, *msmeg_6660*), azotanu i azotynu (*msmeg_0427-0428*, *msmeg_0433*) oraz mocznika (*msmeg_2187*, *msmeg_2978-2982*, *msmeg_3623-3627*) (Jenkins i wsp., 2013; Jessberger i wsp., 2013).

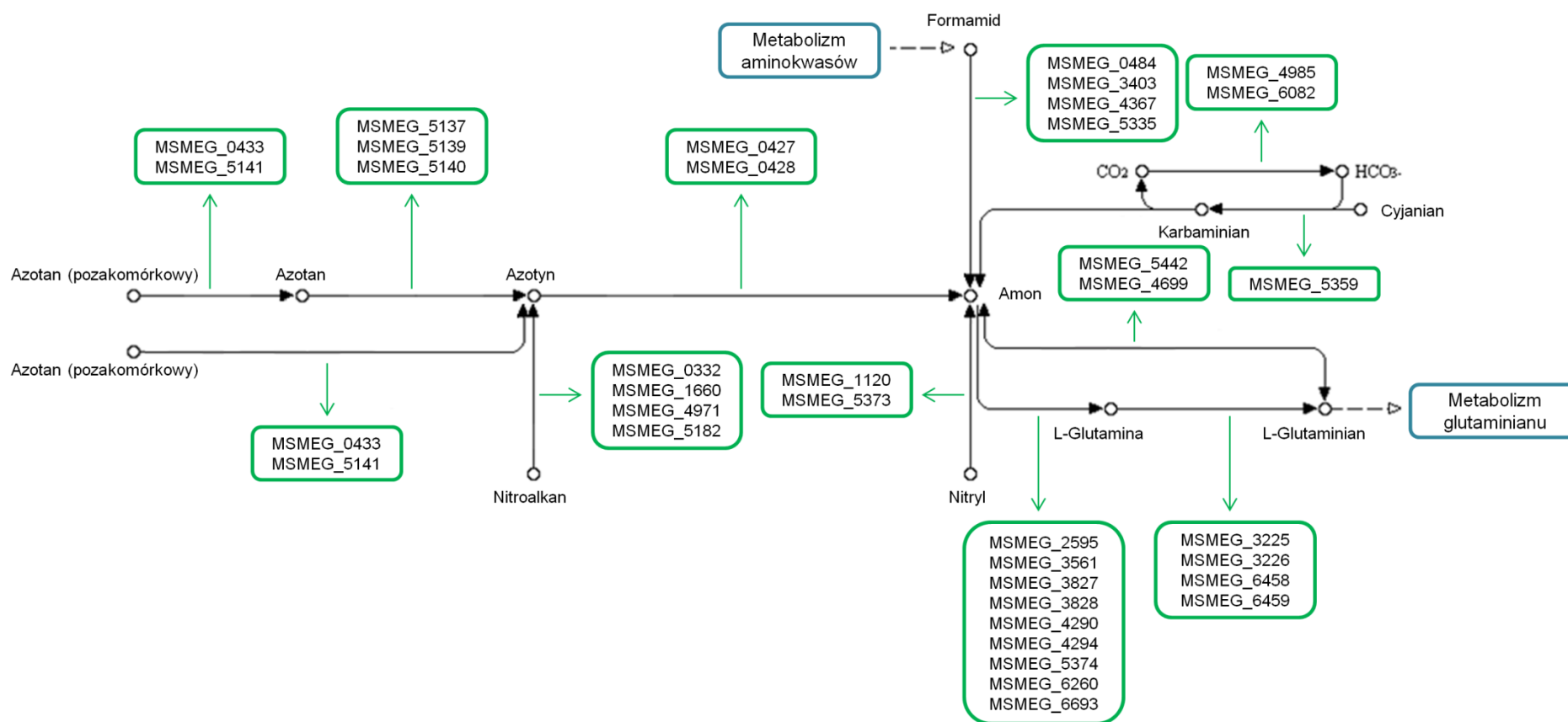


Figura 4. Geny zaangażowane w metabolizm związków azotowych u *M. smegmatis* (w oparciu o dane z bazy KEGG PATHWAY).

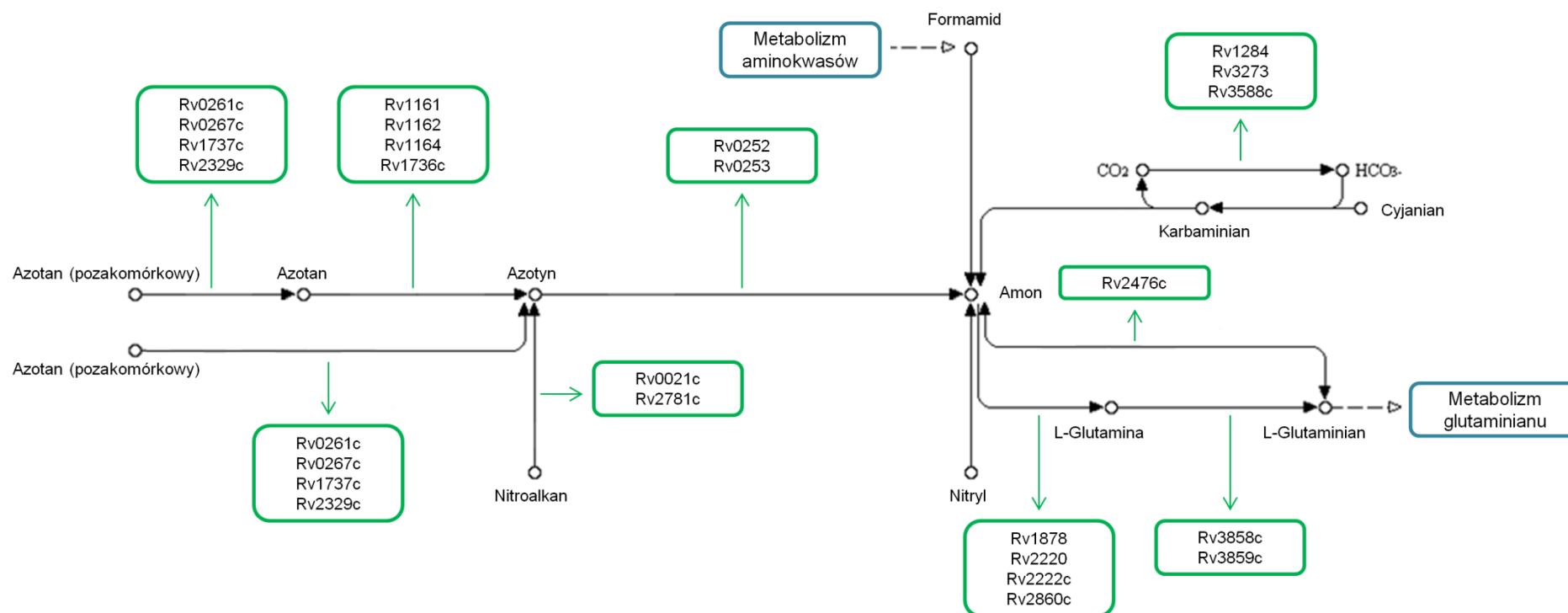


Figura 5. Geny zaangażowane w metabolizm związków azotowych u *M. tuberculosis* (w oparciu o dane z bazy KEGG PATHWAYS).

1.4.3. Asymilacja azotu

U bakterii azot włączany jest do glutaminy i glutaminianu przy udziale dwóch odrębnych szlaków, niezależnie od ATP w obecności NAD(P)H przez dehydrogenazę glutaminianową (GDH) lub zależnie od ATP w obecności NADPH przez syntetazę glutaminową/syntetazę glutaminianową (GS-GOGAT) (Merrick i Edwards, 1995).

1.4.3.1. Dehydrogenaza glutaminianowa

W reakcji katalizowanej przez GDH, w obecności NAD(P)H, kwas α -ketoglutarowy i jon amonowy ulega odwracalnemu przekształceniu w L-glutaminian. Asymilacja azotu na drodze tego szlaku jest preferowana, kiedy środowisko jest bogate w jony amonowe, ze względu na stosunkowo niski koszt energetyczny oraz małe powinowactwo enzymu do amonu. Obecne u bakterii GDH rozróżniają kofaktor NADH od NADPH i często funkcjonują zależnie od dostępności składników odżywczych bądź stanu fizjologicznego komórki. Enzymy zależne od NADPH charakteryzujące się strukturą heksameryczną (klasa I), występują u mikroorganizmów przetwarzających nieorganiczne źródła azotu, takie jak amon lub azotan i w reakcjach aminacji α -ketoglutaranu umożliwiają pozyskanie NADP⁺ niezbędnego do biosyntezy. GDH wymagające jako kofaktora NADH o budowie tetra- (klasa II) lub heksamerycznej (klasa III) przeważają natomiast u bakterii żyjących w środowisku bogatym w organiczne źródła azotu, katalizując głównie reakcje deaminacji glutaminianu (Veronese i wsp., 1974; Sakamoto i wsp., 1975; Minambres i wsp., 2000; Harper i wsp., 2010).

W genomie *M. smegmatis* występują trzy geny kodujące GDH, z których każda należy do innej klasy. Badania wykazały, że w ciągu pierwszych 30 minut głodu azotowego ekspresja enzymu klasy I kodowanego przez gen *msmeg_5442* ulega obniżeniu, przy jednoczesnym zwiększeniu jego aktywności. Z kolei po dwóch godzinach bez dostępu do azotu, następuje nasilenie ekspresji GDH klasy II i III kodowanych odpowiednio przez geny *msmeg_6272* i *msmeg_4699* (Harper i wsp., 2010). U *M. tuberculosis* funkcję GDH pełni prawdopodobnie produkt genu *rv2476c* wykazujący homologię z genem *msmeg_4699* na poziomie 68% (O'Hare i wsp., 2008). Promieniowce *C. glutamicum* posiadają jeden, a *S. coelicolor* dwa geny kodujące omawiane enzymy (Rehm i wsp., 2010; Kim i Kim, 2016). Interesująca wydaje się być regulacja GDH u *Actinomycetales* biorąc pod uwagę, że ekspresja genów kodujących te enzymy jest niezależna od regulatorów metabolizmu azotu u *M. smegmatis*, podczas gdy u *S. coelicolor* jest kontrolowana przez GlnR, natomiast

u *C. glutamicum* jest zależna od AmtR (Tiffert i wsp., 2008; Hanssler i wsp., 2009; Jenkins i wsp., 2013). Ponadto, zaobserwowano u prątków potranslacyjny mechanizm regulujący aktywność GDH polegający na inhibicji enzymu wskutek bezpośredniego wiązania z niefosforylowanym regulatorem akumulacji glikogenu GarA, pozostającym w komórkach mykobakterii pod kontrolą kinazy białkowej PknG (O'Hare i wsp., 2008; Gouzy i wsp., 2014).

1.4.3.2. Cykl syntetaza glutaminowa/syntaza glutaminianowa

System GS-GOGAT stanowią dwa oddzielne enzymy umożliwiające asymilację amonu w dwuetapowej reakcji. Aktywność tego układu jest preferowana kiedy bakterie znajdują się w środowisku o niskiej zawartości azotu, ze względu na wysokie powinowactwo enzymów do amonu. W reakcji katalizowanej przez GS, w obecności ATP dochodzi do przyłączenia jonów amonowych do L-glutaminianu i utworzenia L-glutaminy, która wchodzi w kolejną reakcję katalizowaną przez GOGAT. Podczas tego etapu następuje przeniesienie grupy aminowej z L-glutaminy na kwas α -ketoglutazarowy, w efekcie czego powstają dwie cząsteczki L-glutaminianu. Synteza glutaminy, która wykorzystuje ok. 15% wewnątrzkomórkowej puli ATP, podlega regulacji na poziomie transkrypcji oraz na poziomie posttranslacyjnym, zabezpieczając komórkę przed utratą energii w środowisku obfitym w azot (Harper i wsp., 2010).

1.4.3.3. Syntetaza glutaminowa

Enzymy GS występują w trzech klasach różniąc się między sobą rozmiarem i liczbą podjednostek oraz kowalentną modyfikacją np. adenylacją. GS klasy I składają się z dwunastu identycznych podjednostek i są szeroko rozpowszechnione u bakterii i archeonów. Do klasy II należą enzymy złożone z dziesięciu podjednostek ułożonych w dwa pentameryczne pierścienie i są charakterystyczne dla eukariontów oraz bakterii glebowych. Ostatnią III klasę tworzą GS utworzone z dwunastu podjednostek składających się w dwa heksamery i występują one u cyjanobakterii oraz niektórych bakterii beztlenowych (Murray i wsp., 2013). W obrębie klasy I rozróżnia się GS- α i GS- β ze względu na brak lub obecność posttranslacyjnego mechanizmu regulującego aktywność enzymatyczną. Enzymy GS- α nie podlegają takiej modyfikacji i są typowe dla archeonów, z kolei GS- β ulegają adenylacji za pośrednictwem transferazy adenylowej GlnE w komórkach niemal wszystkich bakterii (Merrick i Edwards, 1995; Amon i wsp., 2010).

E. coli i *C. glutamicum* dysponują tylko jedną kopią genu kodującego GS, podczas gdy *S. coelicolor* oraz mykobakterie posiadają informację genetyczną dla kilku enzymów

(Reitzer, 2003; Rexer i wsp., 2006; Rehm i wsp., 2010). Geny *glnA1* (*msmeg_4290*, *rv_2220*) i *glnA2* (*msmeg_4294*, *rv2222c*) kodujące GS klasy I są obecne u wszystkich mykobakterii i są zlokalizowane w konserwatywnym regionie wraz z transferazą adenylową GlnE (*msmeg_4293*, *rv2221c*). Ponadto wszystkie prątki, za wyjątkiem *M. leprae* posiadają geny *glnA3* (*msmeg_3561*, *rv1878*) i *glnA4* (*msmeg_2595*, *rv2860c*), a *M. smegmatis* jeszcze dodatkowe sześć genów kodujących dwa enzymy wykazujące homologię z GlnA4 (*msmeg_1116*, *msmeg_3828*), dwa białka o podobieństwie do GS Gram-ujemnych proteobakterii (*msmeg_3827*, *msmeg_5374*) oraz dwa hipotetyczne białka budową przypominające GS klasy III (*msmeg_6260*, *msmeg_6693*) (Amon i wsp., 2009). Wykazano, że spośród czterech genów kodujących GS u *M. tuberculosis*, najważniejszą funkcję w komórce pełni *glnA1*, który jako jedyny ze wszystkich GS jest niezbędny do wzrostu w warunkach *in vitro* i w porównaniu z pozostałymi genami ulega silnej ekspresji (Harth i wsp., 2005). Zaobserwowano również, że w przeciwieństwie do *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* wydziela duże ilości GS do środowiska. Spekuluje się, że zjawisko to może być związane z syntezą poliglutaminy obecnej w ścianie komórkowej patogennych prątków lub/i udziałem GS w zmianie pH fagosomu wynikającej z metabolizmu amonu (Harth i wsp., 1994; Harper i wsp., 2010).

Regulacja GS u bakterii odbywa się na poziomie transkrypcji oraz posttranslacyjnie. Geny kodujące GS są pod kontrolą różnych regulatorów metabolizmu azotu, w zależności od mikroorganizmu i ulegają indukcji w odpowiedzi na głód azotowy. U *S. coelicolor*, *Bacillus subtilis* i mykobakterii funkcję regulatora pełni GlnR, następnie AmtR u *C. glutamicum* i NtrBC u enterobakterii (Schreier i wsp., 2000; Fink i wsp., 2002; Beckers i wsp., 2005; Jenkins i wsp., 2013). Mechanizmy posttranslacyjne dotyczą modulacji aktywności enzymatycznej na drodze adenylacji i deadenylacji podjednostek przez transferazę adenylową GlnE, w odpowiedzi na różne wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe bodźce (Almassy i wsp., 1986).

1.4.3.4. Syntaza glutaminianowa

Enzymem współdziałającym z GS jest GOGAT, który podobnie jak poprzednie białkowe katalizatory można podzielić na trzy klasy, biorąc pod uwagę jego budowę oraz rodzaj cząsteczki wymaganej do przeprowadzenia reakcji. Do klasy I należą szeroko rozpowszechnione u bakterii enzymy GOGAT bogate w centra żelazowo-siarkowe i zbudowane z dwóch różniących się wielkością podjednostek. Mniejsza podjednostka kodowana przez gen *gltD* pełni funkcję oksydoreduktazy NADPH zależnej od koenzymu

FAD i generuje elektrony niezbędne do przeprowadzenia reakcji włączenia L-glutaminy do kwasu α -ketoglutazarowego, która ma miejsce na dużej podjednostce, kodowanej przez *gltB* (Andersson i Roger, 2002). Klasę II stanowią GOGAT złożone z jednej podjednostki, wymagają do działania kofaktora NADH i występują między innymi u roślin i grzybów. Do III klasy także przynależą enzymy utworzone z pojedynczego polipeptydu, lecz w odróżnieniu do GOGAT klasy II, są zależne od ferredoksyny, a taki rodzaj biokatalizatorów występuje najczęściej u cyjanobakterii oraz roślin wyższych (van den Heuvel i wsp., 2004).

Geny *gltD* i *gltB* są u mykobakterii wysoce konserwatywne, aczkolwiek w genomie *M. smegmatis* obecne są po dwa dodatkowe geny kodujące każdą z podjednostek GOGAT. Do tej pory nie zidentyfikowano mechanizmu kontrolującego transkrypcję i aktywność GOGAT u prątków, choć wiadomo, że jest to regulacja niezależna od GlnR (Amon i wsp., 2009). U promieniowców *C. glutamicum* natomiast, podobnie jak w przypadku pozostałych enzymów zaangażowanych w metabolizm azotu, ekspresja *gltD* i *gltB* pozostaje pod kontrolą AmtR (Beckers i wsp., 2001).

1.4.4. Regulatory metabolizmu azotu

Jak już wspomniano, głównymi regulatorami metabolizmu azotu u mykobakterii są białka GlnR i AmtR. Należą one do dwóch różnych typów czynników transkrypcyjnych, lecz ich wspólną cechą jest regulacja ekspresji genów, w odpowiedzi na zmiany poziomu azotu w środowisku. Należy jednak podkreślić, że prócz globalnych regulatorów, ważną rolę w mechanizmach regulacyjnych pełni także szeroko rozpowszechnione u bakterii i roślin białko P_{II} (Williams i wsp., 2013; Petridis i wsp., 2016).

1.4.4.1. GlnR

Białko regulatorowe GlnR należy do czynników transkrypcyjnych z rodziny OmpR, charakteryzujących się obecnością motywu strukturalnego helisa-skręt-helisa w domenie wiążącej DNA (Martinez-Hackert i Stock, 1997). Białko OmpR jest częścią bardzo dobrze opisanego u *E. coli* TCS EnvZ – OmpR, w którym ulega fosforylacji na konserwatywnej reszcie asparaginianu (Yoshida i wsp., 2006). Obecność specyficznego motywu oraz konserwatywnego miejsca fosforylacji w GlnR sugeruje, że to „sieroce” białko, także ulega aktywacji przy udziale partnerskiej kinazy, do tej pory jednak nie zidentyfikowanej (Jenkins i wsp., 2012).

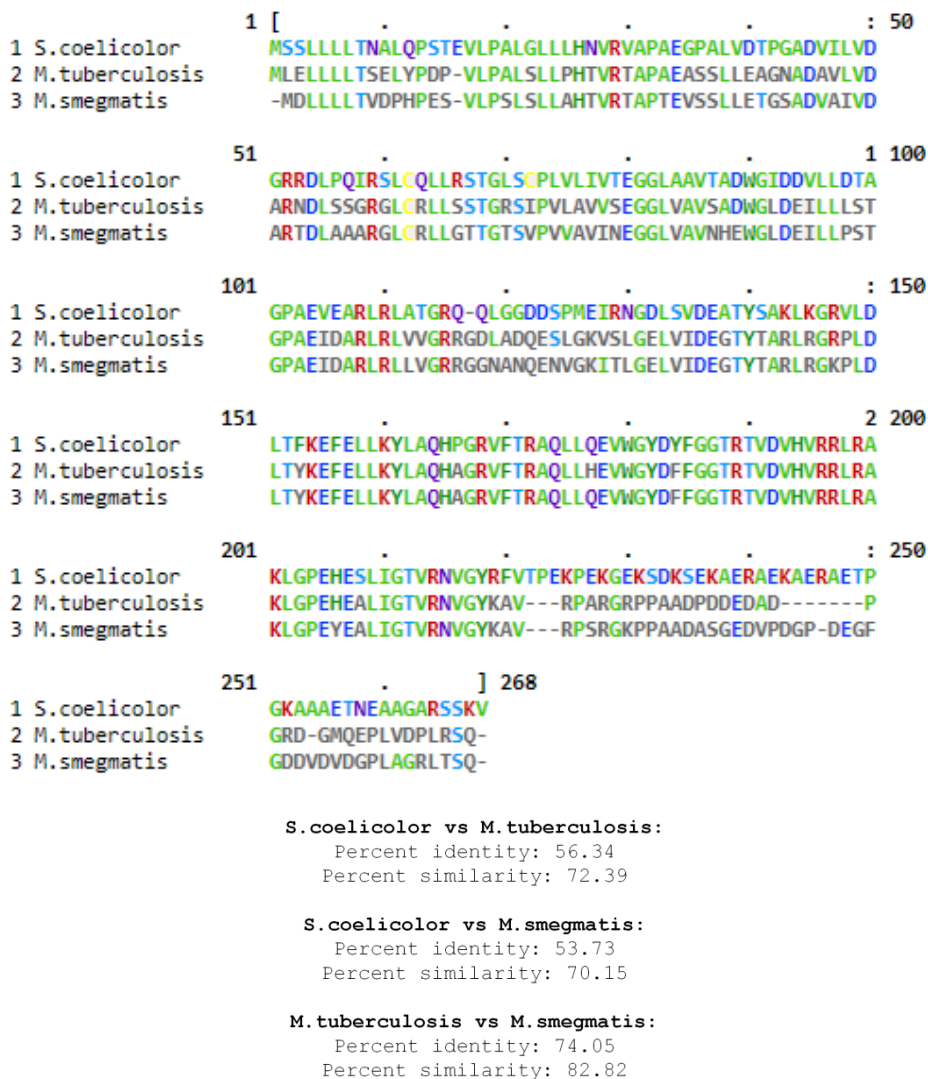


Figura 6. Podobieństwo sekwencji aminokwasów białek GlnR u różnych gatunków bakterii (opracowane za pomocą programów Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation oraz Sequence Manipulation Suite).

Jak wcześniej wspomniano GlnR reguluje ekspresję wielu genów u *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, w odpowiedzi na ograniczony dostęp azotu. Dane literaturowe wskazują na nieco odrębną rolę GlnR w metabolizmie azotu u szybko i wolno rosnących prątków, co ma związek z fizjologią obu gatunków. U saprofitycznych mykobakterii GlnR kontroluje szereg genów zaangażowanych w asymilację azotu pochodzącego z rozmaitych źródeł, z kolei u prątków gruźlicy, regulator ten wpływa na ekspresję genów biorących udział w detoksykacji tlenu azotu oraz redukcji azotanów i azotynów, umożliwiając adaptację patogenu do niekorzystnych wewnątrzkomórkowych warunków. Zarówno dla jednego jak i drugiego gatunku mykobakterii określono motyw konsensusowy, za pomocą którego GlnR wiąże się

do DNA (Jenkins i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015). Analogiczne analizy wykonano także dla innych promieniowców między innymi *S. coelicolor* i *Streptomyces venezuelae*. U obu gatunków GlnR reguluje geny związane z pozyskiwaniem amonu, syntezą glutaminy, redukcją azotynów oraz metabolizmem mocznika. Ponadto, u tych promieniowców występuje także drugi regulator określany jako GlnRII. Jego funkcje co prawda nie są w pełni poznane, niemniej jednak zaobserwowano, że białko to wiąże się do kilku regionów rozpoznawanych przez GlnR (Tiffert i wsp., 2008; Pullan i wsp., 2011). Interesujące wydają się być ostatnie doniesienia literaturowe dotyczące GlnR promieniowców *Saccharopolyspora erythraea*, *S. coelicolor* i *M. smegmatis*. Z przeprowadzonych analiz wynika, że w warunkach głodu azotowego białko to wpływa na ekspresję genów kodujących deacetylazy lizyny, enzymy odpowiedzialne za potranslacyjną modyfikację histonów. Co ciekawe, zaobserwowano, że GlnR *S. erythraea* oraz *S. coelicolor* działa jako aktywator transkrypcji odpowiednio dwóch (*sace_1779* i *sace_3798*) i trzech genów (*sco3330*, *sco0452* i *sco6464*), podczas gdy ten sam regulator u *M. smegmatis* funkcjonuje jako represor transkrypcji jednego genu (*msmeg_4620*) kodującego enzym (Xu i wsp., 2017).

1.4.4.2. AmtR

Drugim globalnym regulatorem metabolizmu azotu u mykobakterii jest czynnik transkrypcyjny AmtR należący do rodziny białek TetR. Charakteryzują się one obecnością motywu helisa-skręt-helisa w N-terminalnej domenie wiążącej DNA oraz domeną dimeryzacyjną zlokalizowaną na C-terminalnym końcu. Białko AmtR występuje w komórce w formie dimeru i reguluje szlaki metaboliczne w odpowiedzi na dostępność azotu, poprzez represję genów w jego obecności oraz derepresję po jego wyczerpaniu (Palanca i Rubio, 2016). U *C. glutamicum* regulator ten wpływa na ekspresję przynajmniej 33 genów zaangażowanych w asymilację amonu, mocznika i kreatyniny. Aktywność AmtR u tych bakterii reguluje adenylowane białko GlnK, które w warunkach głodu azotowego bezpośrednio oddziałuje z represorem, skutkując jego odłączeniem od DNA i włączeniem transkrypcji genów (Beckers i wsp., 2005). Wykazano, że u *M. smegmatis* AmtR kontroluje ekspresję 11 genów, w tym operonu zaangażowanego w metabolizm mocznika, regulowanego także przez GlnR. Do tej pory nie potwierdzono interakcji AmtR i GlnK u szybko rosnących prątków, jednakże zaproponowano mechanizm potranskrypcyjnej regulacji represora przy udziale antysensownego sRNA, w odpowiedzi na zmiany poziomu azotu (Petridis i wsp., 2016). Poszukiwania AmtR u *M. tuberculosis* doprowadziły natomiast do zidentyfikowania białka Rv3610c, aczkolwiek po określeniu jego homologii z AmtR *C. glutamicum* na

poziomie jedynie 28% przyjęto, że represor ten nie występuje u prątków gruźlicy (Harper i wsp., 2010).

1.4.4.3. Białko P_{II}

Regulatorowe białko P_{II} jest homotrimerem tworzącym cylindryczną, trójwymiarową strukturę z odsłoniętymi pętlami T, po jednej na każdym monomerze oraz dwiema mniejszymi pętlami B i C. Konformacja białka P_{II} determinująca jego aktywność jest regulowana poprzez urydylację konserwatywnej reszty tyrozyny na pętli T bądź allosterycznie, przez wiązanie się cząsteczek efektorowych takich jak ATP, ADP czy α -ketoglutaran (Williams i wsp., 2013). U *E. coli* występują dwa białka P_{II} określane jako GlnB i GlnK, które w warunkach ograniczonego dostępu azotu ulegają urydylacji przez transferazę urydylową GlnD. U promieniowców *S. coelicolor*, *C. glutamicum*, *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* obecne jest jedynie białko GlnK, które w odróżnieniu do enterobakterii ulega reakcji adenylacji na konserwatywnej reszcie tyrozyny, przy udziale transferazy adenylowej GlnD (Hesketh i wsp., 2002; Strosser i wsp., 2004; Williams i wsp., 2013).

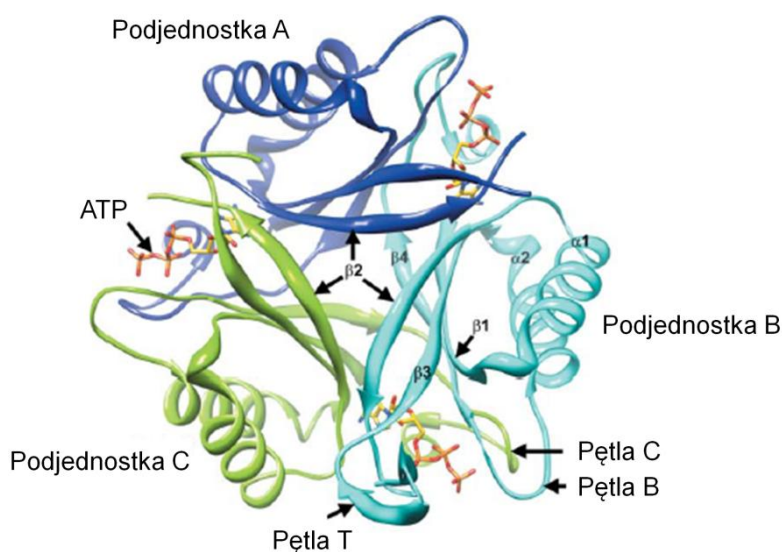


Figura 7. Struktura białka P_{II} *M. tuberculosis* związanego z ATP, z uwzględnieniem struktur drugorzędowych (na podstawie struktury białka opublikowanej przez Shetty i wsp., 2010).

Gen *glnB* u *E. coli* ulega ekspresji konstytutywnej, podczas gdy ekspresja *glnK* jest indukowana głodem azotowym. W przypadku enterobakterii oba białka P_{II} regulują adenylację GS przez transferazę adenylową GlnE oraz są zaangażowane w aktywację TCS NtrBC, który jest nieobecny u mykobakterii (Atkinson i wsp., 1994; Atkinson i Ninfa, 1998; Reitzer, 2003). U *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* potwierdzono adenylację GlnK

w odpowiedzi na głód azotowy, jednak nie zaobserwowano wpływu białka P_{II} na aktywność GS (Williams i wsp., 2013). Geny *glnK* i *glnD* zarówno u *E. coli* jak i u promieniowców znajdują się w operonie wraz z genem *amtB* kodującym transmembranowe białko transportujące jony amonowe. W warunkach dostępności środowiskowego azotu białko GlnK pozostaje związane z kanałem AmtB zapobiegając ciągłemu importowaniu amonu z zewnątrz. W sytuacji jego wyczerpania, w obecności ATP następuje urydylacja lub adenylacja GlnK przez GlnD na konserwatywnej reszcie tyrozyny. Modyfikacja ta powoduje odłączenie GlnK od AmtB i umożliwia aktywny napływ jonów do komórki (Thomas i wsp., 2000; Williams i wsp., 2013). Kolejną istotną funkcją GlnK u promieniowców jest wspomniana już regulacja represora transkrypcji AmtR, jednak nie zgłoszono do tej pory żadnej interakcji pomiędzy białkiem P_{II} a drugim globalnym regulatorem metabolizmu azotu GlnR (Beckers i wsp., 2005).

2. Cel pracy

Głównym celem pracy była charakterystyka „sierocych” białek regulatorowych dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału Rv0195 i Rv0260c u *M. tuberculosis* oraz Msmeg_0432 u *M. smegmatis*.

Cel ten realizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

- ✓ Konstrukcję rekombinowanych szczepów $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* oraz $\Delta msmeg_0432$ *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących analizowane białka, pozwalających na analizę niezbędności genów w komórkach mykobakterii
- ✓ Przygotowanie bakteryjnych modeli ekspresyjnych umożliwiających nadprodukcję rekombinowanych białek Rv0260c, Msmeg_0432 i Msmeg_5784 oraz opracowanie wydajnych systemów ich oczyszczania
- ✓ Analizę komórek mutantu $\Delta msmeg_0432$ *M. smegmatis* z użyciem macierzy fenotypowych
- ✓ Globalną analizę transkryptomu szczepów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* hodowanych w warunkach głodu azotowego
- ✓ Badanie oddziaływań białka Msmeg_0432 z sekwencjami promotorowymi wybranych genów oraz białkiem Msmeg_5784
- ✓ Analizę wzrostu szczepów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* w obecności różnorodnych źródeł azotu oraz ich zdolności do konwersji azotanów do azotynów i azotynów do amoniaku
- ✓ Analizę wrażliwości szczepów $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na obecność reaktywnych form tlenu i azotu, wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Tabela 3.1. Wykaz szczepów bakteryjnych wykorzystywanych w pracy.

Gatunek	Nazwa szczepu	Charakterystyka	Źródło
<i>M. smegmatis</i>	MC ² 155	Szczep referencyjny	Sztok laboratoryjny
<i>M. tuberculosis</i>	H37Rv	Szczep referencyjny, wirulentny	Sztok laboratoryjny
<i>E. coli</i>	Top10F'	Szczep pozbawiony genu kodującego białko RecA	Invitrogen
<i>E. coli</i>	BL21 (DE3) pLysS	Szczep zawierający gen kodujący polimerazę RNA faga T7 oraz plazmid pLysS niosący gen kodujący lizozym faga T7, pozbawiony dwóch proteaz: Ion i OmpT	Novagen
<i>E. coli</i>	Arctic Express (D3)	Szczep zawierający gen kodujący polimerazę RNA faga T7, pozbawiony dwóch proteaz: Ion i OmpT	Sztok laboratoryjny

3.2. Syntetyczne oligonukleotydy DNA wykorzystane w pracy

Oligonukleotydy zostały zestawione w dwóch tabelach. W Tabeli 3.2 umieszczono oligonukleotydy zastosowane do amplifikacji DNA, natomiast w Tabeli 3.3 te, które użyto w testach biochemicznych. Wszystkie oligonukleotydy DNA zostały zsyntetyzowane w firmie Genomed.

Tabela 3.2. Wykaz oligonukleotydów wykorzystanych do amplifikacji DNA.

Nazwa	Sekwencja oligonukleotydów (5'→3')	Zastosowanie
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji fragmentów genów		
Msmeg_0432GR1ScaI-F	CAGTACTCAGTGTCGGGGCAATAATCGC	Amplifikacja fragmentu 5' genu <i>msmeg_0432</i> wraz z sekwencją „powyżej” genu
Msmeg_0432GR2HindIII-R	CAAGCTTCGCACAGTTCATCGGCTCGT	
Msmeg_0432GR3HindIII-F	CAAGCTTGTCGCGGGTGCAGAGGTG	Amplifikacja fragmentu 3' genu <i>msmeg_0432</i> wraz z sekwencją „poniżej” genu
Msmeg_0432GR4KpnI-R	CGGTACCGTTCACCGCGCCGTTTGC	
Rv0260cGR1ScaI-F	CGAGTACTGGGGTCAGTATGGGCCGTTCC	Amplifikacja fragmentu 5' genu <i>rv0260c</i> wraz z sekwencją „powyżej” genu
Rv0260cGR2HindIII-R	CGAAGCTTCCCTGGCGGCGAAGCAAT	

Rv0260cGR3HindIII-F	CGAAGCTTGCTAGAACGCAGCCGTGAATT	Amplifikacja fragmentu 3' genu <i>rv0260c</i> wraz z sekwencją „poniżej” genu
Rv0260cGR4KpnI-R	CGGTACCTCACCCCGCTGTGATCAAAGAT	
Rv0195GR1KpnInat-F	GCCCATCCGATGATCACCG	Amplifikacja fragmentu 5' genu <i>rv0195</i> wraz z sekwencją „powyżej” genu
Rv0195GR2HindIII-R	CGAAGCTTCATCGCGGGTCAACGGGT	
Rv0195GR3HindIII-F	CGAAGCTTACCTGGTCGGCCGCATC	Amplifikacja fragmentu 3' genu <i>rv0195</i> wraz z sekwencją „poniżej” genu
Rv0195GR4-ScaI	CGAGTACTGCCGCCCGTAGTAGAAGA	
Oligonukleotydy wykorzystane do potwierdzenia genotypu mutantów metodą PCR i hybrydyzacji Southern Blotting		
Msmeg_0432-probe-F	CAGATCTATGCGTGAGCCCGACTGGGC	Potwierdzenie genotypu mutantu Δ <i>msmeg_0432</i> SCO/DCO
Msmeg_0432-probe-R	CTCTAGACTCATAACGCGCGTGCCATCTCTG	
Rv0260c-probe-F	CTCTAGAGATGGCCAGGCACACTCGG	Potwierdzenie genotypu mutantu Δ <i>rv0260c</i> SCO/DCO
Rv0260c-probe-R	CGGTACCCGTACGTCATCGTGCCGGCTGTC	
Rv0195-probe-F	CGGATCCGATGGCACCCGGTGAATGTCATTTTCG	Potwierdzenie genotypu mutantu Δ <i>rv0195</i> SCO/DCO
Rv0195-probe-R	CAAGCTTCAAATGAGGCCCGCGCGC	
Oligonukleotydy wykorzystane do potwierdzenia integracji wektorów ekspresyjnych		
MV306-F	GTGGATAACCGTATTACCGC	Potwierdzenie integracji wektora pMV306Km z genami <i>msmeg_0432</i> , <i>rv0260c</i> i <i>rv0195</i>
MV306-R	AAGGCCAGTCTTTTCGACTGAG	
Oligonukleotydy użyte do jakościowej oceny preparatów RNA		
5S_F_SYBR	GTTACGGCGGTCCATAGC	Amplifikacja genu <i>msmeg_4929</i>
5S_R_SYBR	ACCCGGAAGGGTAGTATCAT	
Oligonukleotydy użyte do amplifikacji genów w warunkach nadprodukcji		
Msmeg_0432MV261-F	CAGATCTATGCGTGAGCCCGACTGGGC	Amplifikacja genu <i>msmeg_0432</i> - integracja
Msmeg_0432MV261-R	CAAGCTTCATAACGCGCGTGCCATCTCTG	
Rv0260cMV261-F	CGGATCCATGGCCAGGCACACTCGGC	Amplifikacja genu <i>rv0260c</i> - integracja
Rv0260cMV261-R	CAAGCTTGGTTCATACGTCATCGTGCCGGC	

Rv0195promXbaI-F	CTCTAGACCCACACCGAACTTCTCGCTGC	Amplifikacja genu <i>rv0195</i> wraz z sekwencją własnego promotora - integracja
Rv0195promHindIII-R	CAAGCTTCACCACTCGCTTGGGATCGGC	
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji genów do nadprodukcji białek		
Msmeg_0432MAL-KpnI-F	CGGTACCGATGCGTGAGCCCCGACTGGGC	Amplifikacja genu <i>msmeg_0432</i>
Msmeg_0432MAL-HindIII-R	CAAGCTTCATAACGCGCGTGCCATCTCTG	
Rv0260cSUMO-F	GGCTGTCTTAGAACAGTTAGGAGGTATGGCCC AGGCACACTGGCG	Amplifikacja genu <i>rv0260c</i>
Rv0260cSUMO-R	CGGAGCTGAATTCGGATCCTATACGTCATCGTG CCGGCTG	
Oligonukleotydy wykorzystane do analizy ekspresji genów metodą Real-Time PCR		
Msmeg_0433qRT-F	TGATGACCGTCGTGTTGATG	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_0433</i>
Msmeg_0433qRT-R	GGGTAGAAGGCGTTGATGTT	
Msmeg_0427qRT-F	CGCTACGGACAACAGGATT	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_0427</i>
Msmeg_0427qRT-R	AACCCGAAACACCCATCTT	
Msmeg_5765qRT-F	AACATGTCACGTCTCAAGGG	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_5765</i>
Msmeg_5765qRT-R	CGAAGTGGTGATCGTGATA	
Msmeg_5360qRT-F	CGGTCATGCTGTTCTTCTACA	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_5360</i>
Msmeg_5360qRT-R	GATCTCGTTCCAGATGAAGTAGTC	
Msmeg_1367qRT-F	GTCGACGAGTGCAAAGACAA	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_1367</i>
Msmeg_1367qRT-R	TGGTCTCGTCGAAGTACACG	
Msmeg_1813qRT-F	GAAGTTGGTGCTGCGATGCTTGGC	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_1813</i>
Msmeg_1813qRT-R	GGTGCACGCCAAAGGCAAACCTCAC	
Msmeg_2425qRT-F	TGGCGTTCTTCTACGGCGGAC	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_2425</i>
Msmeg_2425qRT-R	TGGCCGGACGAGAACGACATC	
Msmeg_2982qRT-F	ACACGTCCGGCCCCACCATC	Analiza ekspresji genu <i>msmeg_2982</i>
Msmeg_2982qRT-R	CCGTCTCGCCGATCAGTTCG	

Tabela 3.3. Wykaz oligonukleotydów użytych w testach biochemicznych.

Oligonukleotydy wykorzystane do badania oddziaływań białek z sekwencjami DNA techniką EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)		
Msmeg_0433-F	[HEX]GACCCCTGGTGACCGCGTAAC	Amplifikacja sekwencji promotora genu <i>msmeg_0433</i>
Msmeg_0433-R	CATGCGAGCACGCTAGAAAGC	
Msmeg_0427-F	[HEX]GGCGGTTGTGGCCTGACTGT	Amplifikacja sekwencji promotora genu <i>msmeg_0427</i>
Msmeg_0427-F	CGTGAGCACACCGTGATGGG	
Msmeg_0427-R	CATAGGGCGAGGCTAAGAACCC	
Msmeg_5765-F	[HEX]CGTGTGGCCCTTTCGTTTCGATC	Amplifikacja sekwencji promotora genu <i>msmeg_5765</i>
Msmeg_5765-R	CATGCGTTCAGCGTCGGAGAAC	
Msmeg_5360-F	[HEX]ATCTGCATCATCTCGCGACTTTG	Amplifikacja sekwencji promotora genu <i>msmeg_5360</i>
Msmeg_5360-R	CATTGGGTGCAACCTTCCGAT	
Msmeg_4008-F	[HEX]GCAGCTTGGACCACCTATTT	Amplifikacja sekwencji promotora genu <i>msmeg_4008</i>
Msmeg_4008-R	TCGATGGTGTGCGACGAAGTA	

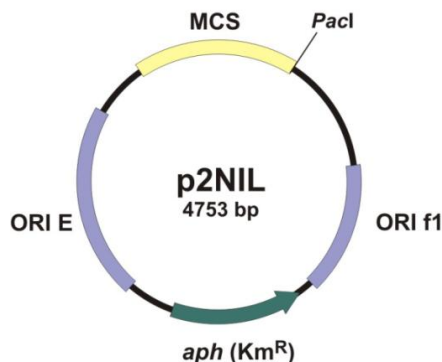
3.3. Wektory plazmidowe

✓ pJET 1.2/bunt (Thermo Scientific)

Wysokokopijny wektor umożliwiający klonowanie produktów PCR zawierających tępe końce. Zawiera obszar *rep* odpowiedzialny za replikację plazmidu, miejsce wielokrotnego klonowania MCS, gen *bla* kodujący β -laktamazę warunkującą oporność na ampicylinę oraz gen *eco47IR* kodujący endonukleazę Eco47IR.

✓ p2NIL (Parish i Stoker, 2000)

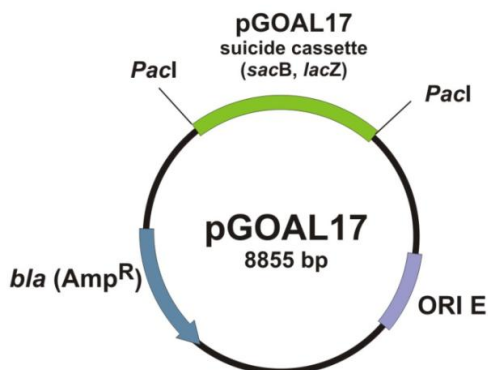
Wektor rekombinacyjny, niereplikujący się u mykobakterii. Zawiera obszar *oriE* umożliwiający replikację w komórkach *E. coli*, gen *aph* kodujący fosfotransferazę aminoglikozydową nadającą oporność na kanamycynę, miejsce wielokrotnego klonowania MCS oraz miejsce *PacI* umożliwiające wklonowanie kasety markerowej pochodzącej z wektora pGOAL17.



Rycina 3.1. Schemat budowy plazmidu p2NIL.

✓ **pGOAL17** (Parish i Stoker, 2000)

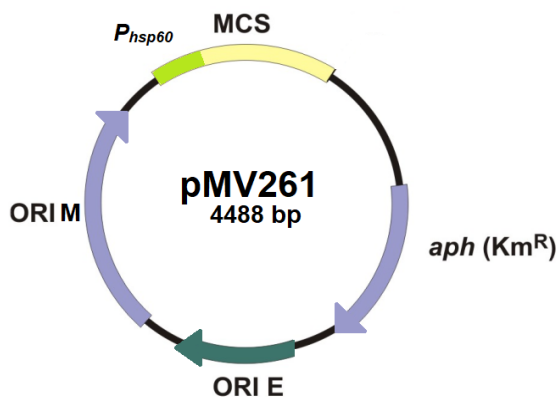
Wektor niosący kasetę markerową, zawierający obszar *oriE* pozwalający na replikację w komórkach *E. coli* oraz gen *bla* kodujący β -laktamazę, nadający oporność na ampicylinę. Na kasecie markerowej znajduje się samobójczy gen *sacB* kodujący lewanosacharazę oraz gen *lacZ* kodujący β -galaktozydazę. Lewanosacharaza przekształca sacharozę do toksycznego dla mykobakterii lewanu, z kolei β -galaktozydaza rozkłada bezbarwny X-gal do niebieskiej pochodnej.



Rycina 3.2. Schemat budowy plazmidu pGOAL17.

✓ **pMV261** (Med-Immune Inc.)

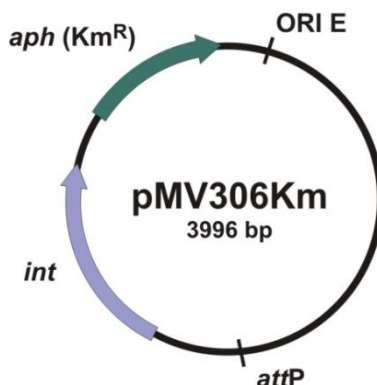
Wektor niosący promotor P_{hsp60} , gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę, miejsce wielokrotnego klonowania MCS, obszar *oriE* umożliwiający replikację w komórkach *E. coli* oraz *oriM* pozwalający na replikację u mykobakterii.



Rycina 3.3. Schemat budowy plazmidu pMV261.

✓ **pMV306Km** (Med-Immune Inc.)

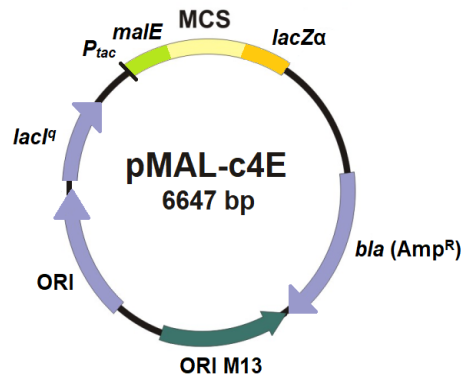
Wektor integracyjny, niosący gen *aph* nadający oporność na kanamycynę, zawierający obszar *oriE* umożliwiający replikację w komórkach *E. coli* oraz system miejscowo-specyficznego rekombinacji pochodzący z mykobakteriofaga L5. W skład tego systemu wchodzi sekwencja fagowa *attP* umożliwiająca wprowadzenie wektora w miejsce *attB* obecne na chromosomie mykobakterii, jak również gen *int* kodujący integrację.



Rycina 3.4. Schemat budowy plazmidu pMV306Km.

✓ **pMAL-c4E** (New England Biolabs)

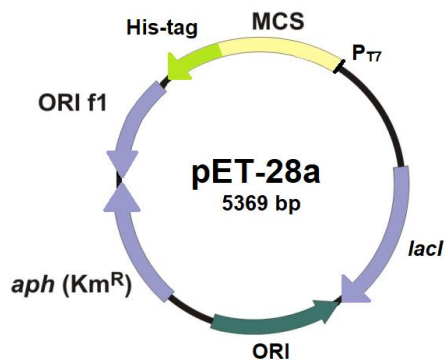
Wektor ekspresyjny niosący gen *malE* kodujący białko wiążące maltozę (MBP), gen *bla* warunkujący oporność na ampicylinę oraz gen *lacI^f* kodujący białko represorowe. Obszar *ori* umożliwia replikację wektora w *E. coli*, natomiast wklonowanie genu w miejsce wielokrotnego klonowania MCS umożliwia ekspresję rekombinowanego genu w fuzji z MBP. Ekspresja ta odbywa się z promotora *P_{tac}* indukowanego IPTG, który w warunkach nieobecności induktora podlega represji.



Rycina 3.5. Schemat budowy plazmidu pMAL-c4E.

✓ **pET-28a** (Novagen)

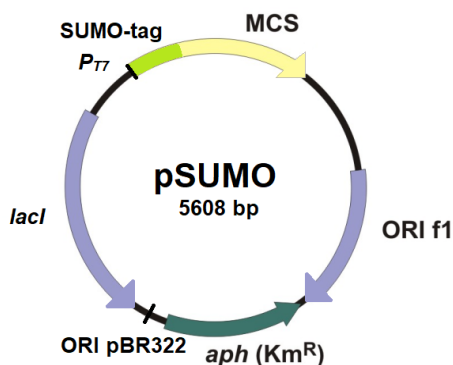
Wektor ekspresyjny umożliwiający nadprodukcję rekombinowanego białka w fuzji z etykietą histydynową (His), niosący gen *lacI* kodujący białko represorowe, gen *aph* nadający oporność na kanamycynę oraz zawierający miejsce *ori* pozwalające na replikację w komórkach *E. coli*. Ekspresja genu wklonowanego w miejsce MSC odbywa się z promotora P_{T7} indukowanego IPTG. Podczas braku induktora promotor ten ulega represji.



Rycina 3.6. Schemat budowy plazmidu pET-28a.

✓ **pSUMO** (LifeSensors Inc.)

Wektor pozwalający na ekspresję rekombinowanego białka w fuzji z małym białkiem podobnym do ubikwityny oraz etykietą histydynową (SUMO). Plazmid posiada miejsce *ori* umożliwiające inicjację replikacji w komórkach *E. coli*, gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę oraz gen *lacI* kodujący represor. Ekspresja genu odbywa się z promotora P_{T7} indukowanego IPTG.



Rycina 3.7. Schemat budowy plazmidu pSUMO.

Tabela 3.4. Wykaz wektorów wykorzystanych lub skonstruowanych w trakcie badań.

Komercyjne wektory plazmidowe		
Nazwa	Charakterystyka	Źródło
pJET 1.2/blunt	Wektor do klonowania produktów PCR, Amp ^R	Thermo Scientific
p2NIL	Wektor rekombinacyjny zawierający system replikacji ColE1, niereplikujący się u mykobakterii, Km ^R	Parish i Stoker, 2000
pGOAL17	Wektor niosący kasetę markerową zawierającą gen <i>sacB</i> oraz <i>lacZ</i> , Amp ^R	Parish i Stoker, 2000
pMV261	Wektor zawierający promotor <i>P_{hsp60}</i> , Km ^R	Med-Immune Inc
pMV306Km	Mykobakteryjny wektor integracyjny niosący gen kodujący integrację faga L5, Km ^R	Med-Immune Inc
pMAL-c4E	Wektor posiadający indukowalny promotor <i>P_{tac}</i> , pozwala na ekspresję rekombinowanych białek w fuzji z MPB, umożliwiając ich łatwe oczyszczenie, Amp ^R	New England Biolabs
pET-28a	Wektor niosący indukowalny promotor <i>P_{T7}</i> , umożliwia ekspresję rekombinowanych białek w fuzji z etykietą histydynową, ułatwiając ich oczyszczenie, Km ^R	Novagen
pSUMO	Wektor posiadający indukowalny promotor <i>P_{T7}</i> , pozwala na ekspresję rekombinowanych białek w fuzji z małym białkiem podobnym do ubikwityny oraz etykietą histydynową, umożliwiając ich łatwe oczyszczenie, Km ^R	LifeSensors Inc.

Wektory użyte do manipulacji genetycznych w komórkach <i>M. smegmatis</i>		
pMA1	Fragment 5' genu <i>msmeg_0432</i> o wielkości 1560 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA2	Fragment 3' genu <i>msmeg_0432</i> o wielkości 1396 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i KpnI, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA3	Fragment 5' genu <i>msmeg_0432</i> o wielkości 1560 pz wklonowany do wektora p2NIL, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA4	Fragment 3' genu <i>msmeg_0432</i> o wielkości 1396 pz wklonowany do wektora pMA3, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i KpnI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA5	Kaseta markerowa z wektora pGOAL17 wklonowana do wektora pMA4, ograniczona sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA6	Gen <i>msmeg_0432</i> wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy BglII i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA7	Gen <i>msmeg_0432</i> z sekwencją promotora <i>P_{hsp60}</i> wklonowany do wektora pMV261, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy XbaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA8	Gen <i>msmeg_0432</i> z sekwencją promotora <i>P_{hsp60}</i> wklonowany do wektora pMV306Km, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy XbaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
Wektory użyte do manipulacji genetycznych w komórkach <i>M. tuberculosis</i>		
pMA9	Fragment 5' genu <i>rv0260c</i> o wielkości 1616 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA10	Fragment 3' genu <i>rv0260c</i> o wielkości 1254 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i KpnI, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA11	Fragment 5' genu <i>rv0260c</i> o wielkości 1616 pz wklonowany do wektora p2NIL, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska

pMA12	Fragment 3' genu <i>rv0260c</i> o wielkości 1254 pz wklonowany do wektora pMA11, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i KpnI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA13	Kaseta markerowa z wektora pGOAL17 wklonowana do wektora pMA12, ograniczona sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA14	Gen <i>rv0260c</i> wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy BamHI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA15	Gen <i>rv0260c</i> z sekwencją promotora <i>P_{hsp60}</i> wklonowany do wektora pMV261, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy XbaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA16	Gen <i>rv0260c</i> z sekwencją promotora <i>P_{hsp60}</i> wklonowany do wektora pMV306Km, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy XbaI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA17	Fragment 5' genu <i>rv0195</i> o wielkości 911 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy KpnI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA18	Fragment 3' genu <i>rv0195</i> o wielkości 1270 pz wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i ScaI, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA19	Fragment 5' genu <i>rv0195</i> o wielkości 911 pz wklonowany do wektora p2NIL, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy KpnI i HindIII, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA20	Fragment 3' genu <i>rv0195</i> o wielkości 1270 pz wklonowany do wektora pMA19, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i ScaI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA21	Kaseta markerowa z wektora pGOAL17 wklonowana do wektora pMA20, ograniczona sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA22	Gen <i>rv0195</i> z sekwencją własnego promotora wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy XbaI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA23	Gen <i>rv0195c</i> z sekwencją własnego promotora wklonowany do wektora pMV306Km, Km ^R	Niniejsza praca doktorska

Wektory użyte do konstrukcji mutantów <i>E.coli</i> nadprodukcujących rekombinowane białka		
pMA24	Gen <i>msmeg_0432</i> wklonowany do wektora pJET 1.2, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy KpnI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA25	Gen <i>msmeg_0432</i> wklonowany do wektora pMAL-c4E, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy KpnI i HindIII, Amp ^R	Niniejsza praca doktorska
pMA26	Gen <i>rv0260c</i> wklonowany do wektora pSUMO, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy BamHI i BsaI, Km ^R	Niniejsza praca doktorska

3.4. Enzymy

✓ Enzymy do amplifikacji DNA

Polimeraza DNA AccuPrime Pfx (Invitrogen)

Polimeraza DNA KAPA Taq (KAPA BIOSYSTEMS)

✓ Enzymy do łączenia fragmentów DNA

Ligaza T4 (Fermentas)

Polimeraza DNA T4 (Invitrogen)

✓ Enzymy do trawienia DNA

TURBO DNA-free™ Kit (Ambion)

✓ Enzymy do trawienia RNA

RNaza (Sigma-Aldrich)

✓ Enzymy restrykcyjne FastDigest™ (Fermentas)

Tabela 3.5. Wykaz stosowanych enzymów restrykcyjnych.

Nazwa enzymu	Pochodzenie bakteryjne	Rozpoznawana sekwencja nukleotydowa 5'-3' oraz miejsce przecinania
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	↓ GGATCC CCTAGG ↑
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	↓ AGATCT TCTAGA ↑
EcoRV	<i>Escherichia coli</i> RFL32	↓ GATATC CTATAG ↑
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i> R _d	↓ AAGCTT TTCGAA ↑
KpnI	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8	↓ GGTACC CCATGG ↑
NdeI	<i>Neisseria denitrificans</i>	↓ CATATG GTATAC ↑
PacI	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	↓ TTAATTAA AATTAATT ↑
SalI	<i>Streptomyces albus</i>	↓ GTCGAC CAGCTG ↑
ScaI	<i>Streptomyces caespitosus</i>	↓ AGTACT TCATGA ↑
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	↓ CCCGGG GGGCCC ↑
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	↓ TCTAGA AGATCT ↑

3.5. Mieszaniny reakcyjne**✓ Reakcja amplifikacji DNA (PCR)**

DNA	1 µg
Bufor 10×stężony	5 µl
DMSO (Sigma-Aldrich)	2 µl
dNTP Mix 2,5 mM (Thermo Scientific)	1 µl
Oligonukleotydy 10 pM	1 µl + 1 µl

Polimeraza DNA	1 U
H ₂ O	do objętości końcowej 50 µl

✓ **Łączenie fragmentów DNA przy użyciu ligazy DNA T4**

Wektor plazmidowy	20 – 100 ng
DNA wstawki	w stosunku od 1:1 do 5:1 względem plazmidu
Bufor 10×stężony	2 µl
Ligaza DNA T4	1 U
H ₂ O	do objętości końcowej 20 µl

✓ **Łączenie fragmentów DNA przy użyciu polimerazy DNA T4**

Wektor plazmidowy	20 – 100 ng
DNA wstawki	w stosunku od 1:1 do 3:1 względem plazmidu
Bufor 5×stężony	4 µl
Polimeraza DNA T4	0,5 U
H ₂ O	do objętości końcowej 20 µl
dNTP 10 mM	2,2 µl

✓ **Trawienie enzymami restrykcyjnymi**

DNA	1 µg
Bufor 10×stężony	2 µl
Enzym	1 U
H ₂ O	do objętości końcowej 20 µl

✓ **Mieszanina do syntezy cDNA**

Całkowity RNA	1 µg
Heksanukleotyd starterowy	1 µl
Bufor reakcyjny	1 µl
H ₂ O DEPC	do objętości końcowej 8 µl
First-Strand Reaction Mix 2×stężony	10 µl
SuperScriptIII/RNase OUT Enzyme Mix	2 µl

✓ **Mieszanina do analizy qRT-PCR**

cDNA	50 ng
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix	12,5 µl
Oligonukleotydy 10 mM	0,75 µl + 0,75 µl
H ₂ O DEPC	do końcowej objętości 25 µl

✓ **Mieszanka do testu EMSA**

Bufor 10×stężony	2 µl
Glicerol 50%	1 µl
MgCl ₂ 1 M	0,4 µl
Poly (dI-dC) 1 µg/µl	1 µl
NP-40 1%	1 µl
β-merkaptioetanol 0,143 M	1,4 µl
DNA nieznakowany (opcjonalnie)	w stosunku 1:100 względem znakowanego DNA
DNA znakowany HEX	30 nM
Białko	2 µM/4 µM
H ₂ O	do końcowej objętości 20 µl

3.6. Podłoża mikrobiologiczne✓ **Podłoże Luria-Bertani (LB) płynne****pH=7**

Trypton (BioShop)	10 g/L
Ekstrakt drożdżowy (BioShop)	5 g/L
Chlorek sodu (BioShop)	5 g/L

✓ **Podłoże LB stałe****pH=7**

Podłoże LB płynne z dodatkiem agaru (BioShop)	2%
-----------------------------------------------	----

✓ **Podłoże LB wzbogacone suplementami****pH=7**

Trypton (BioShop)	10 g/L
Ekstrakt drożdżowy (BioShop)	5 g/L
Chlorek sodu (BioShop)	5 g/L
Glukoza (Sigma-Aldrich)	0,05%
Chlorek amonu (BioShop)	50 mM
Siarczan sodu (BioShop)	5 mM
Siarczan magnezu (BioShop)	2 mM
Wodorofosforan sodu (BioShop)	25 mM
Diwodorofosforan potasu (BioShop)	25 mM
Glicerol (BioShop)	0,5%

✓ **Podłoże Middlebrook 7H9/OADC płynne****pH=7**

Middlebrook 7H9 Broth (Difco)	4,7 g/L
Tween 80 (Sigma-Aldrich)	0,05%

Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	10%
✓ Podłoże Middlebrook 7H9/OADC-S płynne	pH=7
Middlebrook 7H9 Broth (Difco)	4,7 g/L
Tween 80 (Sigma-Aldrich)	0,05%
Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	10%
Kazeina (Sigma-Aldrich)	0,1%
✓ Podłoże Middlebrook 7H10/OADC stałe	pH=7
Middlebrook 7H10 Agar (Difco)	19 g/L
Glicerol (BioShop)	0,5%
Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	10%
✓ Podłoże Sautona pozbawione źródła azotu	pH=7
Diwodorofosforan potasu (BioShop)	0,05%
Siarczan magnezu (BioShop)	0,05%
Kwas cytrynowy (BioShop)	0,2%
Cytrynian żelaza III (BioShop)	0,005%
Siarczan cynku (BioShop)	0,0001%
Tyloxapol (Sigma-Aldrich)	0,015%

✓ **Podłoże Sautona z różnymi źródłami azotu**

Podłoża z różnymi źródłami azotu przygotowywano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości związku stanowiącego źródło azotu, w podłożu Sautona pozbawionym źródła azotu. Podłoża z mocznikiem doprowadzano do wartości pH=4,5 natomiast podłoża z histydyną, leucyną, proliną i metioniną do wartości pH=9,5. Pozostałe podłoża charakteryzowały się wartością pH=7. Przygotowane podłoża sterylizowano przy użyciu filtrów strzykawkowych.

✓ Podłoże stałe YNB pozbawione źródła azotu	pH=7
Yeast Nitrogen Base (BioShop)	1,74 g/L
AD	10%

✓ **Podłoże stałe YNB z azotanem sodu**

Podłoże przygotowywano poprzez dodanie jałowego roztworu azotanu sodu do podłoża YNB pozbawionego źródła azotu przed zestaleniem, do uzyskania końcowego stężenia związku w podłożu 10 mM.

Prawidłowe wartości pH podłoży ustalano za pomocą pH-metru przy użyciu wodorotlenku sodu lub kwasu solnego. Podłoża sterylizowano w autoklawie parą wodną pod ciśnieniem w temperaturze 121°C przez 20 minut (za wyjątkiem podłoży Sautona z różnymi źródłami azotu).

3.7. Antybiotyki oraz inne substancje dodawane do podłoży mikrobiologicznych

✓ Antybiotyki	<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium</i>
Ampicylina (BioShop)	100 µg/mL	-
Kanamycyna (BioShop)	50 µg/mL	25 µg/mL
Chloramfenikol (Sigma-Aldrich)	34 µg/mL	-
Gentamycyna (Sigma-Aldrich)	10 µg/mL	-
Higromycyna (BioShop)	200 µg/mL	50 µg/mL
Tetracyklina-HCl (BioShop)	-	25 ng/ml
✓ Inne substancje		
Sacharoza (BioShop)		2%
X-gal (BioShop)		40 µg/mL

3.8. Odczynniki

β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
 8-hydroksychinolina (Sigma-Aldrich)
 Alantoina (Sigma-Aldrich)
 Albumina surowicy bydłowej (Sigma-Aldrich)
 Azotan sodu (NaNO₃) (Sigma-Aldrich)
 Azotyn sodu (NaNO₂) (Sigma-Aldrich)
 Bromek etydyny (Sigma-Aldrich)
 DETA-NO (Sigma-Aldrich)
 Dihydrostreptomycyna (Sigma-Aldrich)
 Ditiotretitol (DTT) (Sigma-Aldrich)
 DMSO (BioShop)
 DNazol (Invitrogen)
 Etambutol (Sigma-Aldrich)
 Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) (Sigma-Aldrich)
 Glutaminian potasu (Sigma-Aldrich)

Histydyna (Sigma-Aldrich)
 Hydantoina (Sigma-Aldrich)
 Imidazol (Sigma-Aldrich)
 Izopropanol (Merck)
 IPTG (Sigma-Aldrich)
 Kanamycyna (BioShop)
 Kwas moczowy (Sigma-Aldrich)
 Leucyna (Sigma-Aldrich)
 Menadion (Sigma-Aldrich)
 Metionina (Sigma-Aldrich)
 Mocznik (Sigma-Aldrich)
 Nadsiarczan amonu (APS) (Sigma-Aldrich)
 Oksacylina (Sigma-Aldrich)
 Paramomycyna (Sigma-Aldrich)
 Prolina (BioShop)
 Rezazuryna (Sigma-Aldrich)
 Rifampicyna (Sigma-Aldrich)
 RNaza (Sigma-Aldrich)
 Siarczan amonu ((NH₄)₂SO₄) (BioShop)
 Streptomycyna (Sigma-Aldrich)
 TEMED (Sigma-Aldrich)
 Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
 TRIZol (Invitrogen)
 Tween 20 (Sigma-Aldrich)
 Tween 80 (Sigma-Aldrich)
 Tyloxapol (Sigma-Aldrich)
 Walinomycyna (Sigma-Aldrich)
 Wankomycyna (BioShop)

3.9. Bufory i roztwory

3.9.1. Bufory do przeprowadzania procesu elektroforezy

✓ **Bufor TAE do elektroforezy w żelu agarozowym 50×stężony, pH=8**

2 M Trizma

0,5 M EDTA

Wartość pH ustalono za pomocą kwasu octowego

✓ **Bufor TGB do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym 5×stężony**

0,025 M Trizma

0,192 M Glicyna

0,1% SDS

✓ **Bufor TBE do elektroforezy w żelu agarozowym 10 ×stężony pH=8,3**

0,089 M Trizma

0,089 M Kwas borowy

0,002 M EDTA

3.9.2. Bufory obciążające

✓ **Bufor do obciążania próbek DNA 6×stężony**

30% Glicerol

0,25% Błękit bromofenolowy

✓ **Bufor do obciążania próbek białkowych 4×stężony**

40% Glicerol

0,4% Błękit bromofenolowy

8% SDS

400 mM DTT

200 mM Tris-HCl pH=6,8

3.9.3. Bufory do oczyszczania i doczyszczania białek

✓ **Bufory do oczyszczania białek w fuzji z białkiem MBP**

Bufor wiążący i płuczący

20 mM Tris-HCl pH=7,5

200 mM NaCl

1 mM EDTA pH=8

1 mM DTT

Bufor do elucji

20 mM Tris-HCl pH=7,5

200 mM NaCl

1 mM EDTA pH=8

1 mM DTT

10 mM Maltoza

✓ **Bufory do oczyszczania białek w fuzji ze znacznikiem His i SUMO, pH=7,5****Bufor wiążący i płuczący**

0,1% Triton X-100

10 mM Imidazol

1 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,5

10% Glicerol

Bufor do elucji

0,5 M Imidazol

0,5 M NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,5

10% Glicerol

✓ **Bufory do doczyszczania białka systemem AKTA start, pH=6,5****Bufor A**

50 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

10% Glicerol

Bufor B

50 mM Tris-HCl

1 M NaCl

10% Glicerol

Bufor do rozcieńczenia

50 mM Tris-HCl

10% Glicerol

3.9.4. Bufory do hybrydyzacji metodą Southerna✓ **Bufor do neutralizacji, pH=7,5**

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl pH=7,5

✓ **Bufor do denaturacji**

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

✓ **Bufor hybrydyzacyjny**

0,5 M NaCl

4% odczynnik blokujący

✓ **Bufor SSC 20×stężony, pH=7**

0,3 M Cytrynian sodu

3 M NaCl

✓ **Bufor przemywający I**

2 M mocznik

0,1% SDS

50 mM NaH₂PO₄, pH=71 mM MgCl₂

0,2% odczynnik blokujący

✓ **Bufor do depurynacji**

35% HCl

✓ **Bufor przemywający II 20×stężony, pH=10**

2 M NaCl

1 M Tris-HCl

✓ **Bufor przemywający II**

Bufor przemywający II 20×stężony rozcieńczony 20-krotnie

0,2 mM MgCl₂

3.9.5. Bufory do przygotowania komórek kompetentnych✓ **Bufory do przygotowania komórek kompetentnych *E. coli*****Bufor I**

30 mM KOAc

50 mM MnCl₂

100 mM RbCl

10 mM CaCl₂

15% Glicerol

Bufor II, pH=7,0

10 mM NaMOPS

75 mM CaCl₂

10 mM RbCl

15% Glicerol

3.9.6. Bufory i roztwory wykorzystane w metodzie western blot✓ **Roztwór wyjściowy 10×stężony, pH=8,3**

1,92 M Glicyna

250 mM Tris-HCL

✓ **Bufor do transferu**

Roztwór wyjściowy rozcieńczony w 20% metanolu

✓ **Bufor blokujący**

10% mleko w buforze TBS

✓ **Bufor TBS**

200 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,4

✓ **Bufor do rozcieńczeń przeciwciał**

10% mleko w buforze TBS-T

✓ **Bufor TBS-T**

200 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,4

0,05% Tween 20

✓ **Roztwór mysiej surowicy odpornościowej skierowanej przeciwko białku His-Rv0260c**

Surowicę rozcieńczano w buforze do rozcieńczeń w proporcji 1:2000. Surowicę uzyskała dr hab. Bożena Dziadek, prof. nadzw. UŁ, w Katedrze Immunologii i Parazytologii Uniwersytetu Łódzkiego.

✓ **Roztwór króliczych przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową skierowanych przeciwko immunoglobulinom mysim**

Przeciwciała komercyjne (Dako) rozcieńczano w buforze do rozcieńczeń w proporcji 1:1000.

✓ **Roztwór ECL do wywołania reakcji chemiluminescencji**

Mieszanka komercyjnych odczynników w proporcji 1:1 (Cyanagen).

3.9.7. Bufory użyte w metodzie Pull-down

✓ **Bufor do wiązania i płukania, pH=8**

50 mM Tris-HCl pH=8

150 mM NaCl

10% Glicerol

0,1% Triton X-100

10 mM Imidazol

3.9.8. Inne bufory i roztwory

✓ **Mieszanka do ekstrakcji chromosomalnego DNA**

Chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1

✓ **Bufor TE**

10 mM Tris-HCl pH=8

1 mM EDTA pH=8

✓ **AD**

0,5% Albumina surowicy bydlęcej

0,2% Glukoza

3.10. Żele do rozdzielania elektroforetycznego

✓ **Żel agarozowy do rozdzielania fragmentów DNA o wielkości mniejszej niż 100 pb**

2% Agaroz w buforze TAE

0,5 µg/ml Bromek etydyny

✓ **Żel agarozowy do rozdzielania fragmentów DNA o wielkości większej niż 100 pb**

1% Agaroz w buforze TAE

0,5 µg/ml Bromek etydyny

✓ **Żel agarozowy stosowany do rozdzielania kompleksów DNA-białko**

2% agaroz w 0,25×stężonym buforze TBE

✓ **Żel poliakrylamidowy do rozdzielania białek**

Żel rozdzielający

12% Akrylamid

Żel zatężający

5% Akrylamid

0,36 M Tris-HCl pH=8,8

0,1% SDS

0,1% APS

0,1% TEMED

0,1 M Tris-HCl pH=6,8

0,1% SDS

0,1% APS

0,1% TEMED

3.11. Markery wielkości

✓ Markery wielkości DNA

GeneRuler™ 1 kb (Thermo Scientific) – wielkości fragmentów DNA: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000 i 10000 pz

GeneRuler™ 100 pz (Thermo Scientific) – wielkości fragmentów DNA: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 i 1000 pz

✓ Markery wielkości białek

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) – wielkości rekombinowanych białek: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150 i 250 kDa

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) – wielkości wybarwionych rekombinowanych białek: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 180 kDa

3.12. Zestawy komercyjne

✓ Zestaw do izolacji plazmidowego DNA

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

✓ Zestaw do elucji fragmentów DNA z żelu agarozowego

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

✓ Zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR

GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Scientific)

✓ Zestaw do hybrydyzacji typu Southern

ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (GE Healthcare)

✓ Zestaw do badania oddziaływań białek z DNA

LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific)

✓ Zestaw do odwrotnej transkrypcji

SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)

✓ **Zestaw do qRT-PCR**

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific)

✓ **Zestaw do pomiaru stężenia białka metodą Bradforda**

Bradford Reagent (BioShop)

✓ **Zestaw do wywołania reakcji chemiluminescencji w metodzie western blot**

WESTAR SUN (Cyanagen)

✓ **Zestaw do oznaczania stężenia azotynów**

Griess Reagent System (Promega)

✓ **Zestaw do oznaczania stężenia amoniaku**

Ammonium Test (Merck)

✓ **Zestaw do określania integralności RNA**

Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)

✓ **Zestaw do rybodeplecji**

Ribo-Zero® rRNA Removal Kit (Illumina)

✓ **Zestaw do przygotowania bibliotek do analizy RNA-Seq**

KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS)

✓ **Zestaw do analizy ilościowej i jakościowej bibliotek**

Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)

✓ **Zestaw do oznaczania molarności bibliotek**

NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® (New England Biolabs)

3.13. Pozostałe odczynniki i materiały

Filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 µm i 0,45 µm (TPP)

Mieszanina nukleotydów dNTP Mix (Thermo Scientific)

Kolumny do wymiany buforów Sephadex G-25 Desalting Columns (GE Healthcare)

Kolumny HiTrap SP FF (GE Healthcare)

Kulki magnetyczne HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific)

Kulki magnetyczne AMPure XP (Beckman Coulter)

Probówki z kulkami krzemionkowymi o średnicy 0,1 mm Lysing Matrix (MP Biomedicals)

Złoże HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific)

Złoże amylozowe (BioLabs)

Koncentratory do białek Vivaspin® 6, 10 kDa MWCO (GE Healthcare)
 Celulozowa bibuła chromatograficzna (Whatman)
 Membrana nylonowa Amersham Hybond-N (GE Healthcare)
 Membrana PVDF (Thermo Scientific)
 Klisze rentgenowskie Pierce CL-Xposure™ (Thermo Scientific)
 Kasety rentgenowskie (Carl Roth)
 Kulki cyrkonowe o średnicy 0,1 mm (BioSpec Products)
 Barwnik do żeli białkowych Instant Blue (Expedeon)
 Butelki hodowlane 25cm² (Corning)
 GlycoBlue (Invitrogen)
 96-dołkowe płytki polistyrenowe (Nunc)
 Utrwalacz Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher (Sigma-Aldrich)
 Wywoływacz Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher (Sigma-Aldrich)
 Kuwety do elektroporacji (Sigma-Aldrich)

3.14. Aparatura

Wirówka do probówek typu Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf)
 Wirówka do probówek typu Falcon 5804 (Eppendorf)
 Spektrofotometr/Fluorymetr DS-11 FX (DeNovix)
 Spektrofotometr do płytek 96-dołkowych Benchmark Plus (BIO-RAD)
 Termocykler Veriti™ 96-dołkowy (Applied Biosystems)
 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
 Wyrząsarka (Infors Orbitron)
 Mini Beadbeater-8 (BioSpec Products)
 Aparat do elektroporacji (BioRad GenePulser)
 Aparat UV Stratalinker 1800 (Stratagene)
 Wywoływarka filmów rentgenowskich Medical X-ray Processor (Kodak)
 Sonda ultradźwiękowa (Bioblok)
 System do oczyszczania białek AKTA start (GE Healthcare)
 Urządzenie do oznaczania gęstości mikroobów DENSILAMETR II (Erba Lachema)
 Homogenizator FastPrep®-24 (MP Biomedicals)
 Sekwencjator NextSeq 500 (Illumina)
 Urządzenie 7900HT real-time PCR (Applied Biosystems)

Zautomatyzowany inkubator OmniLog (BIOLOG)

Skaner fluorescencyjny Typhoon 8600 Imager Scanner (GE Healthcare)

4. Metody

4.1. Hodowle bakteryjne

Hodowle bakteryjne *E. coli* prowadzono w podłożu LB w temperaturze 37°C przez okres od 16 do 24 godzin, zależnie od potrzeb eksperymentu. Hodowle płynne namnażano w szklanych probówkach lub kolbkach, w których ilość podłoża nie przekraczała 1/5 objętości, na wytrząsarce o ruchu obrotowym, przy prędkości 140 rpm. Hodowle stacjonarne prowadzono na zestalonym podłożu na szalkach Petriego.

Hodowle bakteryjne *M. smegmatis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC lub na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC w temperaturze 37°C. Hodowle płynne namnażano w szklanych kolbkach, w których ilość podłoża nie przekraczała 1/5 objętości, przez okres od 12 do 72 godzin, zależnie od potrzeb eksperymentu, na wytrząsarce o ruchu obrotowym, przy prędkości 140 rpm. Hodowle stacjonarne prowadzono na szalkach Petriego przez okres od 48 do 96 godzin.

Hodowle bakteryjne *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC lub na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC w temperaturze 37°C. Hodowle płynne namnażano w plastikowych butelkach hodowlanych, w których ilość podłoża nie przekraczała 1/5 objętości przez okres od 5 do 14 dni, zależnie od potrzeb eksperymentu. Hodowle stacjonarne prowadzono na szalkach Petriego przez okres od 2 do 3 tygodni.

W celu selekcji mikroorganizmów, na różnych etapach badań do podłoży hodowlanych dodawano antybiotyki lub inne substancje w odpowiednich stężeniach.

4.2. Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA wykonywano przy użyciu gotowego zestawu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta.

4.3. Izolacja chromosomalnego DNA

Izolację chromosomalnego DNA z komórek *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* wykonywano metodą mechanicznej dezintegracji komórek (Yamamoto i wsp., 2001) z modyfikacjami.

Komórki *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* pobierano jałową eżą z podłoża stałego i zawieszano w probówce typu Eppendorf w 200 µl buforu TE z dodatkiem kulek

cyrkoniowych o średnicy 0,1 mm. Komórki rozbijano dwukrotnie przy użyciu Mini Beadbeater-8 z 5 minutową przerwą w łaźni lodowej, po czym do próbek dodawano 200 µl DNAzolu w celu lizy komórek. Aby oczyścić chromosomalne DNA do zawiesiny dodawano 200 µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy i wytrząsano. Po 10 minutach próbki wirowano w temperaturze 4°C, przez 20 minut, przy prędkości 14000 rpm, po czym przenoszono górną, wodną warstwę do nowej próbki typu Eppendorf. W kolejnym etapie DNA precypitowano poprzez dodanie do próbki 3 objętości zimnego 96% etanolu oraz 0,05 objętości 5 M octanu sodu, w celu zagęszczenia i oczyszczenia kwasów nukleinowych. Po 20 minutach inkubacji w łaźni lodowej próbki wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 14000 rpm, następnie osad przemywano 700 µl 70% etanolu i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Uzyskany osad suszono i zawieszano w 70 µl dejonizowanej H₂O, po czym do próbek dodawano RNAzy w stężeniu 100 µg/ml i prowadzono inkubację przez 30 minut, w temperaturze 37°C, celem pozbycia się zanieczyszczeń w postaci RNA.

4.4. Amplifikacja DNA w reakcji PCR

Amplifikację DNA przeprowadzano z użyciem polimerazy DNA, w buforze załączonym przez producenta enzymu, w objętości końcowej 50 µl. Reakcję PCR rozpoczynała wstępna denaturacja w temperaturze 95°C przez 2 minuty. Kolejny etap stanowiło 35 następujących po sobie cykli, z których każdy składał się z następujących etapów:

- ✓ Denaturacja – w temperaturze 95°C przez 30 sekund
- ✓ Przyłączanie starterów – w temperaturze zależnej od użytych oligonukleotydów przez 45 sekund
- ✓ Elongacja – w temperaturze 68°C lub 72°C (w zależności od polimerazy) przez 60 sekund (na każde 1000 pz)

Po wszystkich cyklach prowadzono końcową elongację w temperaturze 68°C lub 72°C przez 15 minut, po czym próbki schładzano do temperatury 4°C.

4.5. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Reakcje trawienia endonukleazami DNA prowadzono w buforze dostarczonym przez producenta enzymów restrykcyjnych, w końcowej objętości 20 µl, w temperaturze 37°C, przez okres 30 minut w przypadku trawienia jednym enzymem bądź 60 minut przy zastosowaniu dwóch endonukleaz.

4.6. Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym

Elektroforezę poziomą fragmentów DNA w żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydydny prowadzono w celu rozdzielania cząsteczek o różnych rozmiarach. Oceny wielkości dokonywano w oparciu o komercyjne markery wielkości. Rozdział prowadzono w buforze TAE przy napięciu prądu 5V/cm odległości między elektrodami, w temperaturze pokojowej. Wizualizacja rozdzielonych fragmentów kwasów deoksyrybonukleinowych była możliwa w świetle UV przy długości fali 320 nm.

4.7. Elucja z żeli agarozowych

Elucję fragmentów DNA z żelu wykonywano przy użyciu komercyjnego zestawu QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniami producenta.

4.8. Precypitacja DNA

Precypitację DNA przeprowadzano poprzez dodanie do próbek 3 objętości zimnego 96% etanolu oraz 0,1 objętości 5 M octanu potasu i inkubację w temperaturze -70°C przez 1 godzinę, bądź poprzez dodanie 1 objętości izopropanolu oraz 0,1 objętości 5 M octanu potasu i inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 min. Po inkubacji próbki wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 14000 rpm, osad przemywano 300 μl 70% etanolu i ponownie wirowano w temperaturze pokojowej przez 7 min, przy prędkości 14000 rpm. Supernatant odrzucano a osad suszono przez 15 minut w temperaturze 55°C i zawieszano w 12 μl dejonizowanej H_2O .

4.9. Łączenie fragmentów DNA

Fragmety DNA łączono przy użyciu ligazy DNA T4 w buforze załączonym przez producenta enzymu, w końcowej objętości 20 μl i w temperaturze 22°C przez 1 godzinę.

Łączenia fragmentów kwasów deoksyrybonukleinowych z zastosowaniem polimerazy DNA T4 dokonywano w buforze załączonym przez producenta enzymu, w końcowej objętości 20 μl i w temperaturze pokojowej, przez okres 30 minut. Po tym czasie do reakcji dodawano 2,2 μl 10 mM dNTP, następnie próbki przenoszono na 5 minut do łaźni lodowej, po czym inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C . Po zakończonej inkubacji mieszaninę ponownie przenoszono na 10 minut do łaźni lodowej.

4.10. Oczyszczanie produktów PCR

Uzyskane w reakcji PCR produkty oczyszczano używając komercyjnego zestawu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) według zaleceń producenta.

4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA

Stężenia kwasów nukleinowych wyznaczano za pomocą spektrofotometru DS-11 FX (DeNovix) podającego wartości w ng/ μ l.

4.12. Sekwencjonowanie fragmentów DNA

Poprawność sekwencji DNA sprawdzano poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger, za pomocą urządzenia Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems), które wykonywała dr Małgorzata Korycka-Machała w Instytucie Biologii Medycznej PAN.

4.13. Przygotowanie plazmidowego DNA do rekombinacji

Plazmidowy DNA poddawano działaniu 0,2 M NaOH w obecności 0,02 mM EDTA przez 30 minut, w temperaturze 37°C. Po inkubacji próbki DNA precypitowano i poddawano elektrotransformacji do komórek kompetentnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*.

4.14. Transformacja szczepów *E. coli*

Przygotowanie komórek kompetentnych z zastosowaniem chlorku rubidu

Hodowlę płynną komórek bakteryjnych *E. coli* o objętości 100 ml prowadzono w podłożu LB z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,48 - 0,5$. Następnie hodowlę inkubowano w łaźni lodowej przez okres 30 minut, po czym komórki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 4500 rpm. Osad komórek zawieszano w 30 ml schłodzonego buforu I i inkubowano w łaźni lodowej przez 2 godziny. Po tym czasie komórki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C przy prędkości 2500 rpm, a uzyskany osad zawieszano w 3 ml zimnego buforu II. Zawieszone komórki porcjowano po 50 μ l do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -70°C.

Transformacja metodą szoku termicznego

Komórki kompetentne rozmrażano w łaźni lodowej przez 30 minut, po czym dodawano plazmidowy DNA i inkubowano w łaźni lodowej przez kolejne 30 minut. Po tym czasie komórki poddawano szokowi termicznemu w temperaturze 42°C przez 90 sekund

i schładzano w łaźni lodowej przez 2 minuty. Następnie do komórek dodawano 500 μ l jałowego podłoża LB i inkubowano przez 1 godzinę, w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Po zakończonej inkubacji mieszaninę komórek wysiewano na podłoże stałe LB, zawierające odpowiednie czynniki selekcyjne.

4.15. Elektrotransformacja komórek *M. smegmatis*

Do wprowadzenia obcego DNA do komórek mykobakterii stosowano technikę elektroporacji, w której pod wpływem impulsu elektrycznego, w środowisku wodnym, dochodzi do destabilizacji osłon komórkowych i zwiększenia ich przepuszczalności dla obcego materiału genetycznego.

Przygotowanie komórek kompetentnych

Hodowlę płynną komórek mykobakterii o objętości 100 ml prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6 - 0,8$. Następnie hodowlę inkubowano przez 1,5 godziny w łaźni lodowej, po czym komórki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 8000 rpm. Osad zawieszano w 90 ml 10% schłodzonego jałowego glicerolu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 8000 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie zmniejszając objętość glicerolu, w którym zawieszano komórki, używając 30 ml, a następnie 5 ml 10% glicerolu. Po ostatnim wirowaniu osad komórek zawieszano w 1 ml schłodzonego 10% glicerolu, porcjowano po 100 μ l do jałowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -70°C.

Transformacja przez elektroporację

Komórki kompetentne rozmrażano przez 30 minut w łaźni lodowej, po czym wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 8000 rpm. Osad zawieszano w 100 μ l świeżego, jałowego i schłodzonego 10% glicerolu i do tak przygotowanych komórek dodawano plazmidowego DNA. Zawiesinę mieszano i przenoszono do schłodzonych kuwet, które następnie wkładano do aparatu do elektroporacji, gdzie przy napięciu 2,5 kV, oporze 1000 Ω i pojemności elektrycznej 25 μ F przeprowadzano elektrotransformację. Po zakończonym procesie zawartość kuwety przenoszono do probówki typu Falcon z 5 ml podłoża płynnego Middlebrook 7H9/OADC. Po 20 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, hodowlę wysiewano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC

zawierające odpowiednie czynniki selekcyjne i inkubowano w temperaturze 37°C przez 3-4 dni.

4.16. Elektrotransformacja komórek *M. tuberculosis*

Przygotowanie komórek kompetentnych

Komórki mykobakterii namnażano w objętości 10 ml w podłożu płynnym Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC, w temperaturze 37°C, do momentu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,8 - 1$. Po tym czasie do komórek dodawano jałowej glicyny do uzyskania końcowego stężenia 1,5%. Hodowlę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, a następnie wirowano przez 10 minut w temperaturze 25°C, przy prędkości 4500 rpm. Osad zawieszano w 10 ml ogrzanego do temperatury 37°C jałowego 10% glicerolu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze 25°C, przy prędkości 4500 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie. Po ostatnim wirowaniu osad komórek zawieszano w 400 μ l ogrzanego 10% glicerolu, porcjowano po 200 μ l do jałowych probówek typu Eppendorf i poddawano elektroporacji.

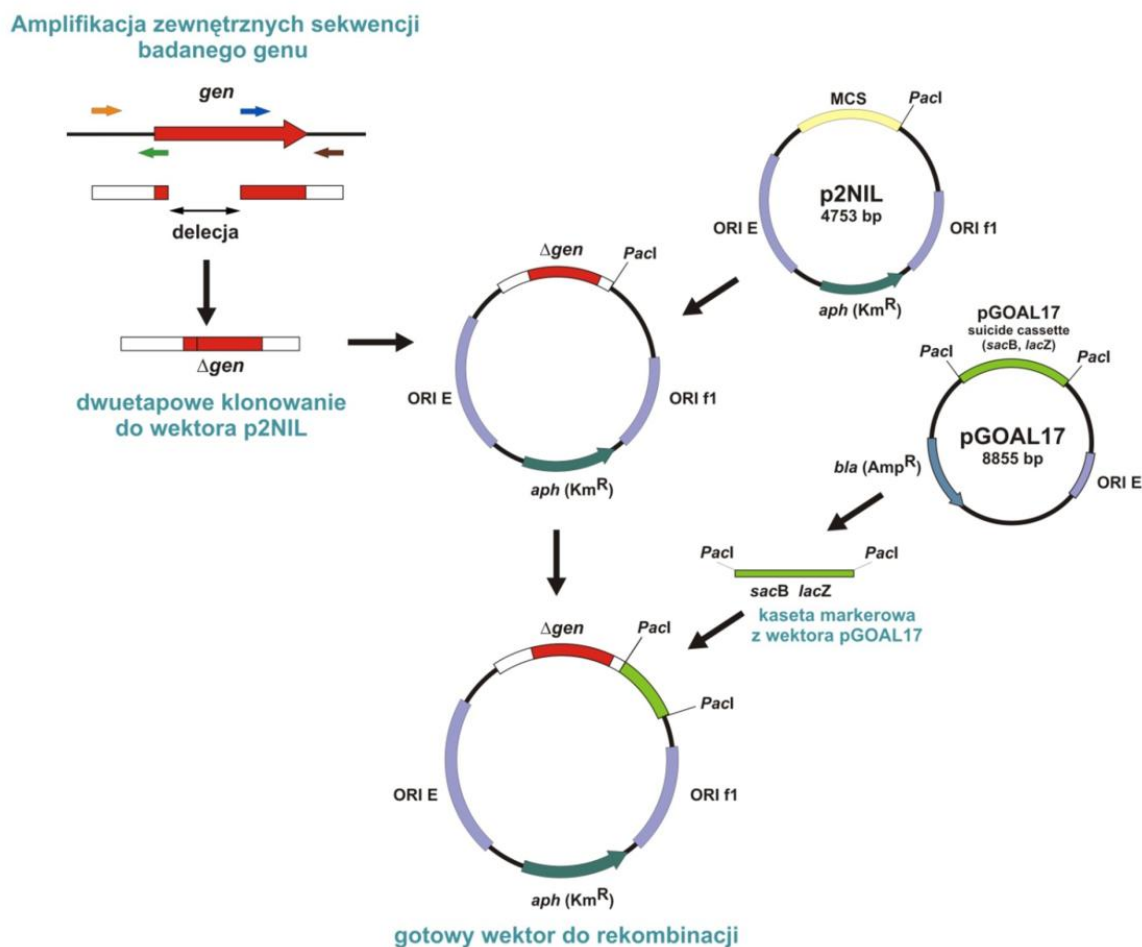
Transformacja przez elektroporację

Do komórek kompetentnych dodawano plazmidowego DNA, mieszano i przenoszono przygotowaną zawiesinę do ogrzanych kuwet, które następnie wkładano do aparatu do elektroporacji, gdzie przy napięciu 2,5 kV, oporze 1000 Ω i pojemności elektrycznej 25 μ F przeprowadzano elektrotransformację. Po zakończonym procesie zawartość kuwety przenoszono do probówki typu Falcon z 5 ml podłoża płynnego Middlebrook 7H9/OADC. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C, hodowlę wysiewano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC zawierające odpowiednie czynniki selekcyjne i inkubowano w temperaturze 37°C, przez okres 4-6 tygodni.

4.17. Konstrukcja wektora do homologicznej rekombinacji

Wektory do homologicznej rekombinacji przygotowywano poprzez wklonowanie fragmentów DNA „oskrzydających” badany gen wraz z wewnętrzną delecją do wektora p2NIL niosącego geny markerowe. Należą do nich: gen *aph* nadający oporność na kanamycynę, gen *lacZ* kodujący enzym rozkładający X-gal oraz gen *sacB* nadający wrażliwość na sacharozę. Ich obecność pozwala na selekcję rekombinantów uzyskanych na etapie tworzenia się mutantów SCO (pojedynczych krzyżowych rekombinantów) oraz DCO

(podwójnych krzyżowych rekombinantów). Schemat konstrukcji wektorów do homologicznej rekombinacji przedstawiono na Rycinie 4.1.

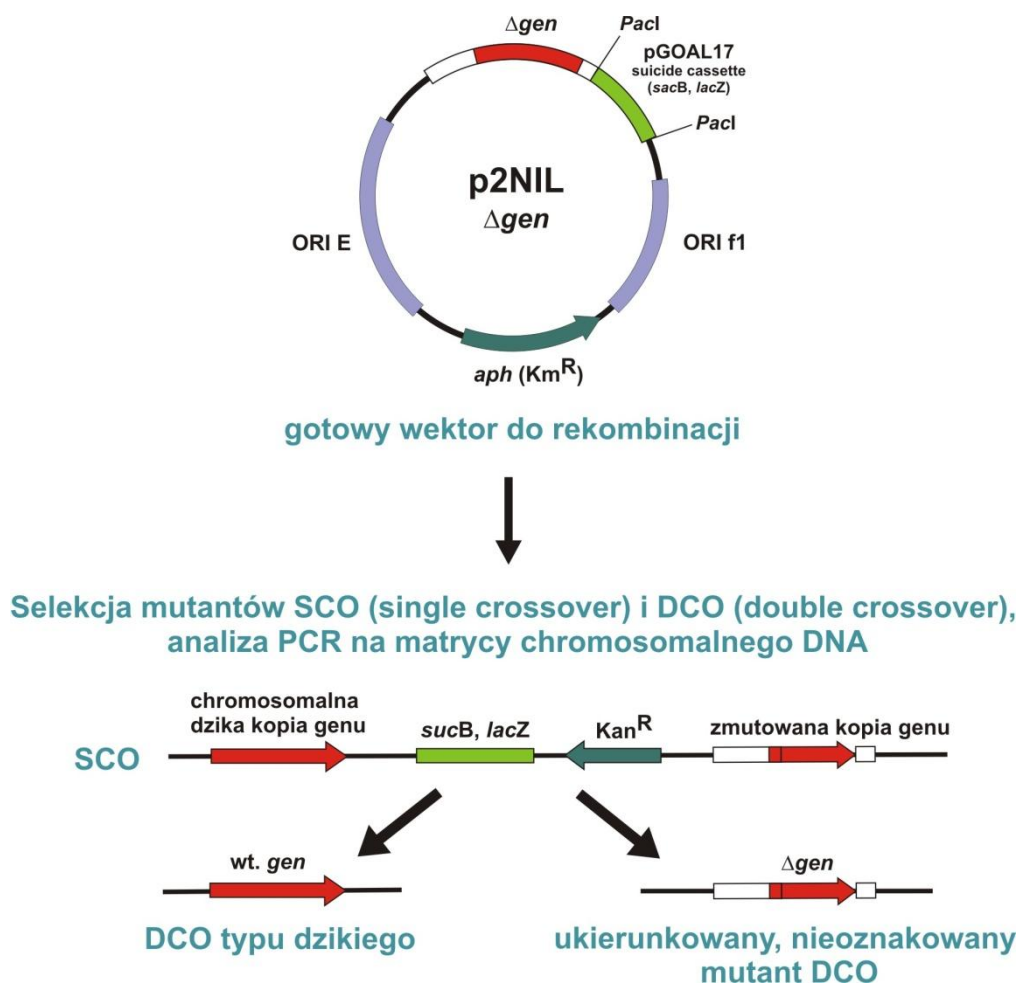


Rycina 4.1. Schemat konstrukcji wektora do homologicznej rekombinacji.

4.18. Otrzymywanie mutantów SCO i DCO

Do komórek kompetentnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* wprowadzano na drodze elektroporacji skonstruowane wektory do homologicznej rekombinacji. Mutanty SCO uzyskiwano w wyniku zajścia pojedynczej rekombinacji homologicznej, efektem której była integracja plazmidowego DNA do chromosomu mykobakterii w sąsiedztwie sekwencji homologicznych. Proces ten powodował nabycie przez komórki cech kodowanych przez geny obecne na plazmidzie (*aph*, *lacZ*, *sacB*), co umożliwiało selekcję mutantów SCO, w genomie których znajdowała się „dzika” i zmutowana kopia badanego genu.

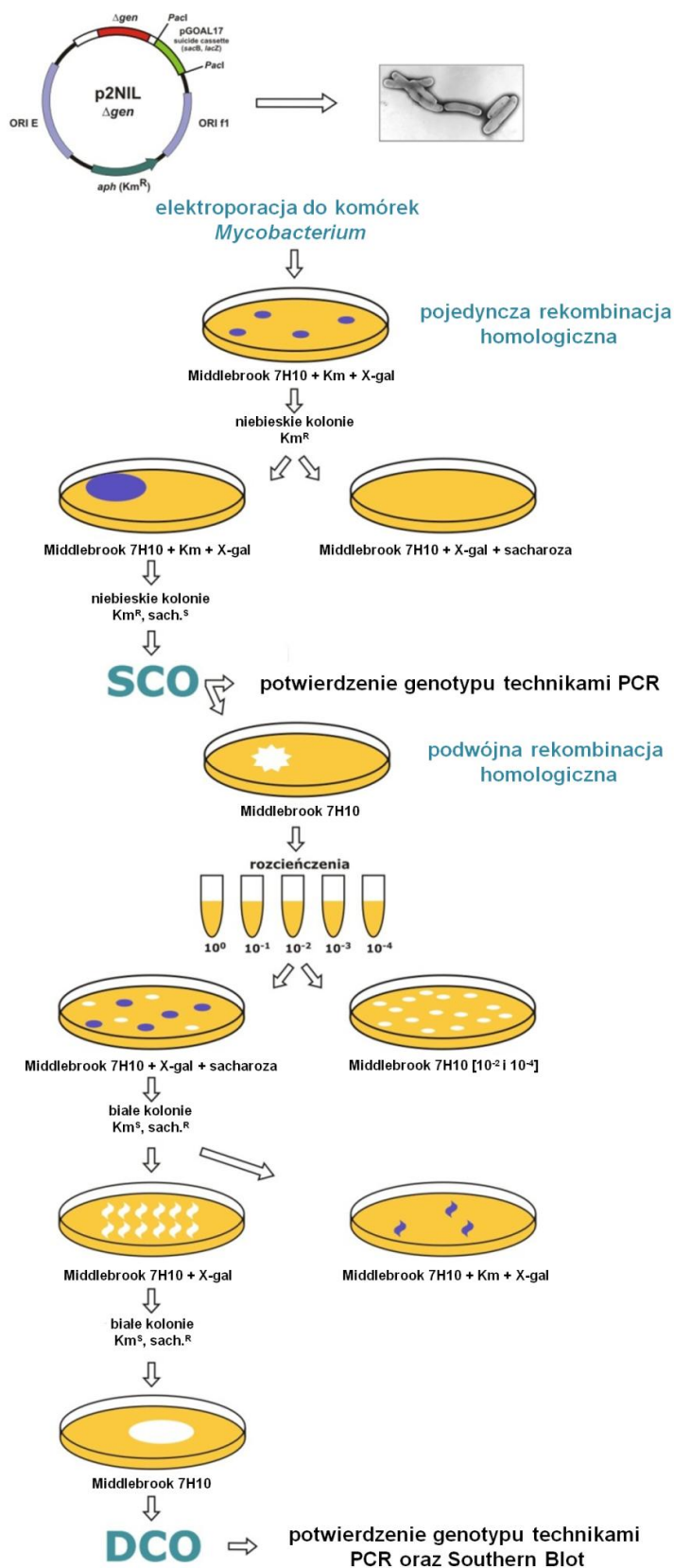
Mutanty DCO uzyskiwano w wyniku zajścia podwójnej rekombinacji homologicznej, prowadzącej do utracenia plazmidowego DNA, z jednoczesną delecją genów markerowych oraz delecją dzikiej lub zmutowanej kopii badanego genu. Schemat otrzymywania mutantów SCO i DCO przedstawiono na Rycinie 4.2.



Rycina 4.2. Schemat uzyskiwania mutantów SCO i DCO.

4.19. Poszukiwanie mutantów SCO i DCO

Selekcji mutantów SCO i DCO dokonywano na podłożach stałych zawierających czynniki selekcyjne, w oparciu o cechy, które mutanty nabyły bądź utraciły podczas rekombinacji homologicznej. Na Rycinie 4.3. przedstawiono poszczególne etapy selekcji mutantów SCO i DCO.

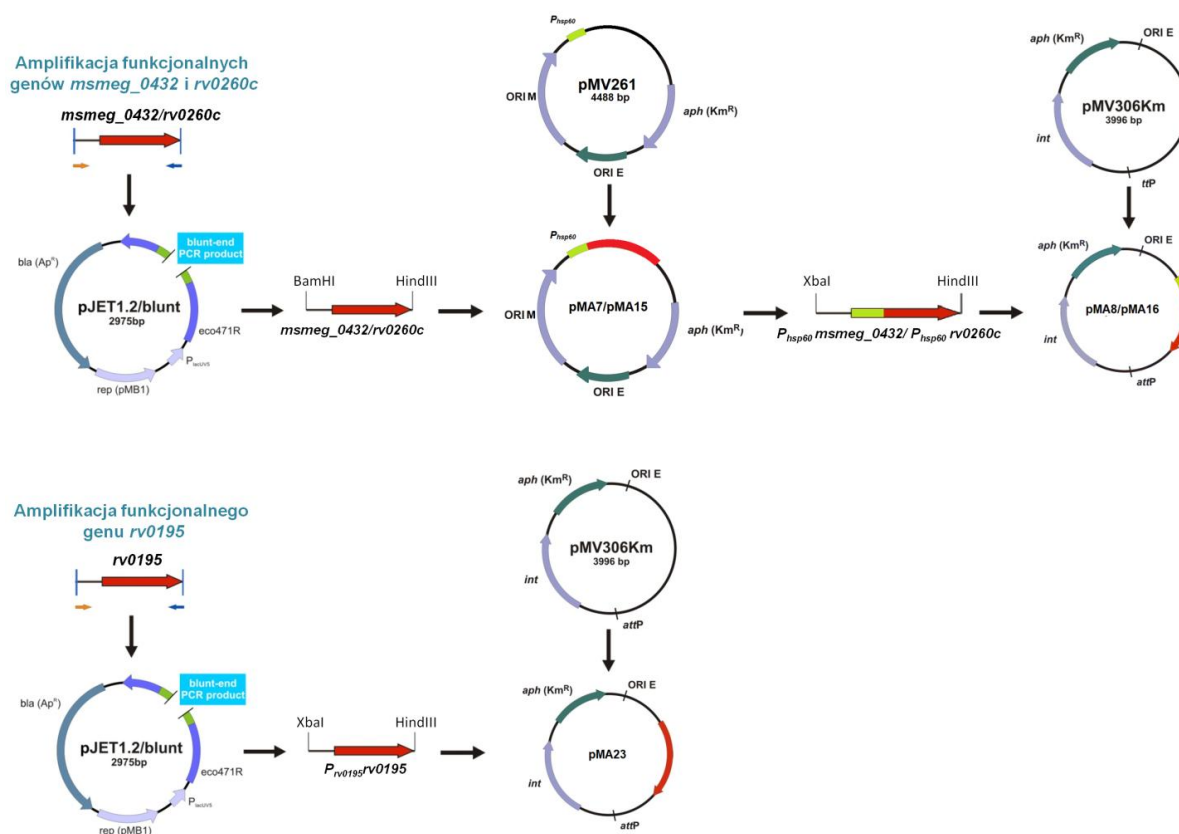


Rycina 4.3. Schemat selekcji mutantów SCO i DCO.

4.20. Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów typu DCO

Konstrukcja wektorów integracyjnych wymagała amplifikacji genów *msmeg_0432*, *rv0260c* i *rv0195* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*, w zależności od pochodzenia genu. Gen *rv0195* amplifikowano wraz z sekwencją potencjalnego promotora.

Sekwencje kodujące geny *msmeg_0432* i *rv0260c* wklonowano niezależnie do wektora pMV261 pod kontrolę promotora P_{hsp60} , z którego następnie wycięto je wraz z sekwencją promotora i wklonowano do wektora integracyjnego pMV306Km. Sekwencję kodującą gen *rv0195* wraz z sekwencją własnego promotora wklonowano bezpośrednio do wektora pMV306Km. Etapy konstrukcji poszczególnych wektorów do komplementacji przedstawiono na Rycinie 4.4.



Rycina 4.4. Schemat konstrukcji wektorów do komplementacji mutantów.

4.21. Hybrydyzacja metodą Southern blot

Potwierdzenia genotypu mutantów DCO *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* dokonywano metodą Southern blot, stosując odczynniki pochodzące z komercyjnego zestawu do hybrydyzacji ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (GE Healthcare).

Przygotowanie i przeniesienie DNA na membranę nylonową, w oparciu o metodę kapilarną

Genomowy DNA w ilości 2 μg trawiono odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi i rozdzielano w 0,8% żelu agarozowym przez 2 godziny, pod napięciem 70 V. Żel płukano po kolei w roztworach: depurynującym przez 10 minut, denaturującym (dwukrotnie) przez 15 minut oraz neutralizującym (dwukrotnie) przez 15 minut. Po każdej zmianie buforu, żel przepłukiwano wodą destylowaną. Na kuwecie wypełnionej 20 \times stężonym buforem SSC umieszczano szklaną płytkę do transferu, przykrytą bibułą Whatmana nasączoną w 20 \times stężonym buforze SSC w taki sposób, aby jej końce były zanurzone w buforze wypełniającym kuwetę. Na bibułę nakładano żel agarozowy, na którym następnie umieszczano nylonową membranę o rozmiarach żelu nasączoną 2 \times stężonym buforem SSC, 6 arkuszy bibuły Whatmana, z których pierwsze 3 były nasączone 2 \times stężonym buforem SSC, a kolejne 3 były suche. Całość przykrywano 10-centymetrową warstwą materiału ssącego, którym były ręczniki papierowe, pod obciążeniem. Przygotowany transfer prowadzono przez 16 godzin w temperaturze pokojowej. Obecna w układzie siła kapilarna powodowała przesiąkanie przez układ 20 \times stężonego buforu SSC i podsączenie ręczników papierowych, w efekcie czego zachodził transfer DNA z żelu na nylonową membranę.

Utrwalenie DNA na nylonowej membranie

Po całonocnym transferze membranę z DNA płukano w 2 \times stężonym buforze SSC, następnie suszono i utrwalano w świetle UV, w aparacie UV Stratalinker 1800 (Stratagene) (auto cross link - 1200 μJ x 100).

Znakowanie sondy

Znakowanie DNA będącego sondą polegało na kowalencyjnym wiązaniu polianionu sondy z termostabilną alkaliczną fosfatazą, w obecności aldehydu glutarowego posiadającego właściwości sieciujące. Sondę amplifikowano w reakcji PCR przy użyciu odpowiednich starterów, następnie 100 ng produktu doprowadzonego do stężenia 10 ng/ μl inkubowano przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej, po czym schładzano w łaźni lodowej. Do próbki

dotychczas dodawano 10 μ l buforu reakcyjnego, 2 μ l odczynnika znakującego oraz 10 μ l aldehydu glutarowego. Przygotowaną mieszaninę inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C.

Prehybrydyzacja i hybrydyzacja

Membranę umieszczano w tubie hybrydyzacyjnej, którą następnie wypełniano ogrzonym do 55°C buforem hybrydyzacyjnym, w ilości 0,125 ml buforu na 1 cm² membrany. Tubę umieszczano w ogrzonym do 55°C piecu hybrydyzacyjnym i inkubowano przez 1 godzinę. Po tym czasie do buforu dodawano wyznakowaną według instrukcji producenta sondę i prowadzono 12 godzinną inkubację w temperaturze 55°C.

Detekcja sygnału

Po inkubacji membranę płukano dwukrotnie przez 10 minut w temperaturze 55°C, buforem przemywającym I, ogrzonym do tej samej temperatury. Następnie, membranę umieszczano w czystej kuwecie i dwukrotnie płukano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, buforem przemywającym II. Przepłukaną membranę odsączano z nadmiaru buforu i przenoszono do nowej, czystej kuwety. Na powierzchnię membrany наносono odczynnik do detekcji w ilości 40 μ l na 1 cm² membrany i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę umieszczano w przezroczystej folii i w kasecie rentgenowskiej. W ciemności na membranę nakładano kliszę rentgenowską, którą poddawano 1 godzinnej ekspozycji. Po tym czasie kliszę wywoływano w automatycznej wywoływarce Medical X-ray Processor (Kodak).

4.22. Globalna analiza transkryptomu

Indukcja głodu azotowego w hodowlach szczepów *M. smegmatis*

Szczep dziki oraz szczepy badanych mutantów *M. smegmatis* hodowano w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 100 ml, z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6-0,8. Hodowle te wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm, następnie osad zawieszano w 50 ml podłoża Sautona pozbawionym źródła azotu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie zmniejszając objętość podłoża, w którym zawieszano komórki, używając 30 ml, a następnie 10 ml podłoża. Zawiesiny komórek wykorzystywano do zaszczepiania 100 ml podłoża Sautona pozbawionego źródła azotu, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,1. Do przygotowanych hodowli dodawano siarczanu amonu

stanowiącego w podłożu jedyne źródło azotu, do uzyskania końcowego stężenia w hodowli 1 mM i 30 mM. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem, oznaczając w wybranych punktach czasowych obecność jonów amonowych w hodowlach. Po dwóch godzinach od całkowitego wyczerpania jonów amonowych w hodowlach zawierających początkowo 1 mM siarczanu amonu, wszystkie hodowle wirowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm. Hodowle, w których początkowe stężenie siarczanu amonu wynosiło 30 mM, stanowiły kontrolę eksperymentu. Osady komórek przechowywano w temperaturze -70°C.

Oznaczanie stężenia jonów amonowych w hodowlach *M. smegmatis* metodą kolorymetryczną

Stężenie jonów amonowych w hodowlach *M. smegmatis* zawierających siarczan amonu jako jedyne źródło azotu wyznaczano za pomocą gotowego zestawu Ammonium Test (Merck), zgodnie z zaleceniami producenta.

Izolacja RNA z komórek *Mycobacterium* z użyciem odczynnika TRIzol

Osady komórek zawieszano w 300 µl wody DEPC i przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf. Do zawiesiny dodawano 900 µl odczynnika TRIzol, całość dokładnie mieszano i przenoszono do probówek Lysing Matrix (MP Biomedicals) wypełnionych krzemionkowymi kuleczkami o średnicy 0,1 mm. Probówki przechowywano w łaźni lodowej do czasu dwukrotnej homogenizacji mieszaniny przez 40 sekund (6 m/s) na urządzeniu FastPrep®-24 (MP Biomedicals). W czasie 5 minutowej przerwy między homogenizacjami oraz po ich zakończeniu próbki przechowywano w łaźni lodowej. Po schłodzeniu i osadzeniu się kuleczek na dnie probówki, z nad osadu pobierano supernatant, który przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i wirowano przez 7 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 12000 g. Po wirowaniu, supernatant ponownie przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, celem dysocjacji nukleoprotein związanych z RNA. Po tym czasie do lizatu dodawano 250 µl chloroformu i energicznie mieszano przez 2 minuty. Mieszaninę inkubowano przez 10 minut na lodzie i wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 12000 g. Do nowej probówki typu Eppendorf przenoszono około 2/3 górnej fazy wodnej, którą następnie precypitowano 1 objętością izopropanolu, 1/10 objętością 3 M octanu sodu o pH=5,7 oraz 1 µl odczynnika GlycoBlue (Invitrogen) zwiększającego wydajność precypitacji, którą prowadzono w temperaturze -20°C przez noc. Po nocy próbki wirowano

przez 30 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 20000 g, po czym supernatant dekantowano a osad przemywano 500 µl 70% schłodzonego etanolu. Próbkę ponownie wirowano przez 30 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 20000 g, następnie supernatant dekantowano, natomiast osad suszono w temperaturze pokojowej przez około 15 minut i zawieszano w 40 µl wody DEPC. Uzyskany preparat stanowił mieszaninę RNA i DNA („brudny” RNA), której stężenie oznaczano przy użyciu spektrofotometru DS-11 FX (DeNovix).

W celu usunięcia pozostałości DNA z preparatów RNA, 10 µg „brudnego” RNA trawiono DNazą pochodzącą z komercyjnego zestawu TURBO DNA-free™ Kit (Ambion), według zaleceń producenta, z zastosowaniem buforów i odczynników załączonych w zestawie. Po przeprowadzonej reakcji trawienia, stężenia próbek RNA oznaczano na spektrofotometrze DS-11 FX (DeNovix).

Integralność uzyskanego preparatu RNA określano za pomocą zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies), na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent), zgodnie z zaleceniami producenta.

Usunięcie rRNA z preparatów RNA

Do dalszych etapów analiz wykorzystywano preparaty RNA charakteryzujące się wartością współczynnika integralności RNA powyżej 7. Przed przystąpieniem do procedury eliminacji rRNA z próbek RNA, uzyskane preparaty oczyszczano przy użyciu kulek magnetycznych AMPure XP (Beckman Coulter). Do próbki typu Eppendorf przenoszono próbki RNA, następnie dodawano dwukrotną objętość kulek magnetycznych i mieszano. Po 15 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej, przy użyciu separatora magnetycznego supernatant dekantowano, a następnie do kulek dodawano 200 µl 70% etanolu i inkubowano 30 sekund. Po tym czasie z próbki umieszczonej na separatorze magnetycznym usuwano supernatant i ponownie dodawano 200 µl 70% etanolu. Po zdekantowaniu supernatantu próbki pozostawiano na separatorze magnetycznym w temperaturze pokojowej, do czasu wyschnięcia kulek. Następnie zawieszano je w 13,5 µl wody DEPC, inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej i umieszczano na separatorze magnetycznym. Eluaty zawierające oczyszczone RNA przenoszono do nowych próbek typu Eppendorf i poddawano procedurze usuwania rRNA. Do tego celu wykorzystywano gotowy zestaw Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina), który używano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Przygotowanie bibliotek

Biblioteki do sekwencjonowania przygotowywano z użyciem komercyjnego zestawu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS), według zaleceń producenta. Poszczególne etapy procedury obejmowały fragmentację RNA, syntezę cDNA, syntezę drugiej nici, naprawę i adenylację końców DNA, ligację adapterów oraz amplifikację bibliotek. Uzyskanym bibliotekom nadano 6-nukleotydowe indeksy, przy użyciu odpowiednich oligonukleotydów. Określenie jakości, ilości oraz średniej wielkości bibliotek wykonano na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent), stosując odczynniki gotowego zestawu Agilent DNA 1000 Kit (Agilent), zgodnie z instrukcją producenta, natomiast molarność bibliotek przed sekwencjonowaniem sprawdzono za pomocą gotowego zestawu NEBNext® Library Quant Kit for Illumina® (New England Biolabs).

Sekwencjonowanie bibliotek

Biblioteki sekwencjonowano na urządzeniu NextSeq 500 (Illumina) w Pracowni Biobank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego przez dr Dominika Strapagiela. Wszystkie bioinformatyczne analizy wyników sekwencjonowania RNA, przy użyciu szeregu skryptów i programów wykonał dr Przemysław Płociński, w Instytucie Biologii Medycznej PAN. Indeksy sekwencjonowania usuwano za pomocą oprogramowania Cutadapt, natomiast jakość odczytów sprawdzano w programie Sickle. Przycięte odczyty mapowano do genomu *M. smegmatis* przy użyciu narzędzia Bowtie 2. Zmapowane odczyty zliczono do odpowiednich genów przy użyciu skryptu HTSeq-count, a różnice między testowanymi warunkami analizowano za pomocą internetowej platformy Degust. Do opracowania motywów DNA związanych z regulacją transkrypcji wykorzystano natomiast analizę MEME (Multiple Em for Motif Elicitation).

4.23. Ilościowy PCR z odwrotną transkryptazą (qRT-PCR)

Reakcja odwrotnej transkrypcji (synteza cDNA)

W celu weryfikacji wyników uzyskanych z sekwencjonowania transkryptomu, przeprowadzano analizę ekspresji wybranych genów metodą qRT-PCR (ang. *real-time quantitative reverse transcription PCR*), do której niezbędna była synteza cDNA na matrycy RNA.

Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano zestawu SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Invitrogen), według zaleceń producenta. Reakcję dla 1 µg RNA pozbawionego DNA, w obecności losowych heksanukleotydów starterowych

przygotowywano w objętości 20 μ l. Mieszaninę RNA, heksanukleotydów starterowych oraz buforu uzupełniano wodą DEPC do końcowej objętości 8 μ l i inkubowano przez 5 minut w temperaturze 65°C. Po tym czasie próbkę schładzano do temperatury 4°C, a następnie dodawano 10 μ l 2 \times stężonego First-Strand Reaction Mix oraz 2 μ l SuperScriptIII/RNase OUT Enzyme Mix. Całość poddawano następującym inkubacjom: 10 minut w temperaturze 25°C, 50 minut w temperaturze 55°C oraz 5 minut w temperaturze 85°C. Po zakończonych inkubacjach uzyskany cDNA schładzano do temperatury 4°C i przechowywano w temperaturze -20°C.

Reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Analizę ekspresji genów metodą qRT-PCR wykonywano na urządzeniu 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems) za pomocą komercyjnego zestawu Maxima SYBR green qPCR master mix (Thermo Scientific).

Mieszanina reakcyjna była przygotowywana w objętości 25 μ l i zawierała 50 ng cDNA, 1 \times stężony Maxima SYBR green qPCR master mix oraz 0,3 μ M każdego startera z pary. Reakcja obejmowała początkową aktywację prowadzoną w temperaturze 95°C przez 10 minut oraz 40 cykli składających się z etapów: denaturacji w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączania starterów w temperaturze 62°C przez 30 sekund oraz wydłużania w temperaturze 72°C przez 30 sekund. Krzywą topnienia wyznaczano po zakończonej reakcji, w celu sprawdzenia jednorodności powstałych produktów PCR. Poziomy analizowanych transkryptów odnoszono do poziomu ekspresji genu *sigA* kodującego podjednostkę polimerazy RNA *Mycobacterium*, ulegającego konstytutywnej ekspresji podczas wzrostu bakterii. Reakcje qRT-PCR wykonywano w trzech powtórzeniach, wykorzystując matryce cDNA uzyskane z preparatów RNA wyizolowanych z trzech niezależnych hodowli. Poziomy ekspresji danego genu w szczepach badanych mutantów *M. smegmatis* porównywano z poziomem ekspresji tego samego genu w szczepie dzikim.

Analiza wyników qRT-PCR metodą komparatywną

Metoda komparatywna (Livak i Schmittgen, 2001) umożliwia wyliczenie względnych różnic poziomu ekspresji analizowanego genu między szczepami badanymi, a szczepem dzikim. Poziom analizowanego transkryptu odnoszono do poziomu ekspresji genu referencyjnego *sigA*, kodującego u mykobakterii czynnik σ^{70} . Po przeprowadzonej analizie wyznaczano cykle progowe (C_t – ang. *copy threshold*) reakcji amplifikacji genów badanych

oraz kontrolnych w szczepie dzikim i w szczepach badanych. Dla wszystkich szczepów wyznaczano różnicę pomiędzy wartościami C_t genu analizowanego i genu referencyjnego (ΔC_t):

$$\Delta C_t (\text{szczep badany}) = C_t \text{ genu analizowanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

$$\Delta C_t (\text{szczep dziki}) = C_t \text{ genu analizowanego} - C_t \text{ genu referencyjnego}$$

W kolejnym etapie dla każdego szczepu badanego obliczano wartość podwójnej delty ($\Delta\Delta C_t$):

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{szczep badany}) - \Delta C_t (\text{szczep dziki})$$

Względny poziom ekspresji analizowanego genu między szczepami badanymi, a szczepem dzikim wyznaczano ze wzoru $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Kiedy wartość parametru R jest równa 1, poziom ekspresji genu w szczepie badanym i szczepie dzikim jest taki sam. Wartość poniżej jedności oznacza, że poziom ekspresji w szczepie dzikim jest wyższy niż w szczepie badanym, i na odwrót w przypadku, gdy wartość R jest większa od jedności.

4.24. Ocena wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu stałym zawierającym azotan sodu jako jedyne źródło azotu

Hodowle szczepu dzikiego i szczepów badanych mutantów *M. smegmatis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 20 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Hodowle te rozcieńczano w podłożu Middlebrook 7H9/OADC do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,5$ po czym наносono po 10 μ l hodowli na podłoże stałe YNB z dodatkiem azotanu sodu i rozprowadzono eżą. Jako kontrole eksperymentu stosowano podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC oraz YNB pozbawione źródła azotu. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny.

4.25. Ocena zdolności asymilacji różnych źródeł azotu przez szczepy *M. smegmatis*

Hodowle szczepu dzikiego oraz szczepów badanych mutantów *M. smegmatis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC w objętości 50 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Po tym czasie hodowle wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm, następnie osad zawieszano w 30 ml podłoża Sautona pozbawionego źródła azotu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie zawieszając osad po ostatnim wirowaniu w objętości 10 ml. Zawiesiny komórek wykorzystywano do zaszczepiania 100 ml podłoża Sautona pozbawionego źródła azotu, do uzyskania wartości

współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,2$. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godzin, z wytrząsaniem, celem indukcji głodu azotowego u bakterii. Po tym czasie hodowle wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm, następnie osad zawieszano w 50 ml podłoża Sautona pozbawionym źródła azotu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie zawieszając osad po ostatnim wirowaniu w objętości 10 ml. Zawiesiny komórek używano do zaszczepienia 20 ml podłoża Sautona zawierającego różne źródła azotu, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,1$. Kontrole eksperymentu stanowiły hodowle w podłożu Middlebrook 7H9/OADC oraz w podłożu Sautona pozbawionym źródła azotu. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 72 godziny, z wytrząsaniem monitorując wzrost bakterii poprzez pomiar gęstości optycznej OD_{600} . W określonych punktach czasowych pobierano po 1 ml hodowli, wykonywano szereg rozcieńczeń i wysiewano po 100 μl hodowli na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 godziny, a następnie określano ilość komórek w 1 ml badanych prób (CFU).

4.26. Ocena zdolności konwersji azotanów do azotynów oraz azotynów do amoniaku przez szczepy *M. smegmatis*

Określenie stężenia azotynów w hodowlach w podłożu Sautana z azotanem sodu

U mykobakterii azotany ulegają przekształceniu do azotynów, następnie do amoniaku, który jest podstawowym źródłem azotu wszystkich bakterii. Aby sprawdzić czy szlaki przemian tych związków u badanych szczepów mutantów *M. smegmatis* są aktywne, w hodowlach szczepu dzikiego i szczepów mutantów w podłożu płynnym Sautona zawierającym azotan sodu jako źródło azotu, oceniono stężenie azotynu, produktu konwersji azotanu.

W określonych punktach pomiarowych do probówek typu Eppendorf pobierano po 500 μl hodowli szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów *M. smegmatis* w podłożu Sautona z azotanem sodu. Próbkę wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 8000 rpm, następnie supernatant przenoszono do czystych probówek typu Eppendorf i wykorzystywano do oznaczeń stężeń azotynów.

Ilościowej oceny azotynów dokonywano na 96-dołkowych płytkach, przy użyciu zestawu Griess Reagent System (Promega). Do testu wykorzystywano załączony do zestawu wzorcowy roztwór azotynu pozwalający na wyznaczenie krzywej wzorcowej i obliczenie stężeń azotynów w próbkach. Szereg rozcieńczeń wzorca oraz analizę stężeń azotynów

w próbkach wykonywano na płytce w trzech powtórzeniach, w końcowej objętości 150 μ l, według zaleceń producenta. Pomiaru absorbancji roztworów dokonywano w ciągu 30 minut od zakończenia testu, przy długości fali 550 nm, na spektrofotometrze do płytek 96-dołkowych Benchmark Plus (BIO-RAD). Krzywą wzorcową oraz stężenia azotynów w badanych próbkach wyznaczano w programie Microsoft Excel.

Określenie obecności jonów amonowych w hodowlach w podłożu Sautona z azotanem sodu

W celu sprawdzenia czy szczepy badanych mutantów *M. smegmatis* są zdolne do dalszych przekształceń azotynu do jonów amonowych, w tych samych supernatantach, w których oznaczano stężenie azotynów określano obecność jonów amonowych. Analizę tą przeprowadzano przy użyciu gotowego zestawu Ammonium Test (Merck) w mikroskali (dla 40 μ l supernatantu), według zaleceń producenta.

4.27. Analiza cech fenotypowych szczepów *M. smegmatis* z wykorzystaniem systemu BIOLOG

Technologia BIOLOG umożliwia określenie cech fenotypowych szczepów bakterii na podstawie analizy ich metabolizmu. Testy wykonuje się na 96-dołkowych komercyjnych płytkach zawierających różne źródła azotu, węgla czy też związki hamujące namnażanie się bakterii, na które nanosi się odpowiednio przygotowane hodowle i inkubuje w urządzeniu monitorującym wzrost bakterii. Charakterystyki badanych szczepów dokonuje się w oparciu o kinetykę wzrostu bakterii w różnych warunkach.

Hodowle szczepu dzikiego oraz badanych szczepów mutantów *M. smegmatis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC w objętości 50 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, do czasu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Po tym czasie hodowle wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm, następnie osad zawieszano w 30 ml podłoża Sautona pozbawionego źródła azotu i ponownie wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 4500 rpm. Czynność tę powtarzano jeszcze dwukrotnie zawieszając osad po ostatnim wirowaniu w objętości 10 ml. Zawiesiny komórek wykorzystywano do zaszczipiania 100 ml podłoża Sautona pozbawionego źródła azotu, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,2$. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godzin, z wytrząsaniem, po czym wykorzystywano do analizy cech fenotypowych z użyciem systemu BIOLOG.

Badanie kinetyki wzrostu w obecności różnych związków systemem BIOLOG przeprowadziła dr Anna Żaczek, w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki Uniwersytetu Rzeszowskiego. Komercyjne 96-dołkowe płytki z naniesionymi hodowlami badanych szczepów *M. smegmatis* inkubowano w temperaturze 30°C przez 72 godziny, w urządzeniu BIOLOG Omnilog rejestrującym dane dotyczące kinetyki wzrostu bakterii co 15 minut. Dla każdej studzienki uzyskiwano krzywą aktywności metabolicznej i odczytywano wartości powierzchni pola pod wykresem, które następnie analizowano w programie Microsoft Excel. Uzyskane dane pochodziły z dwóch niezależnych eksperymentów.

4.28. Konstrukcja plazmidów do nadprodukcji rekombinowanych białek

Przygotowanie wektorów do nadprodukcji rekombinowanych białek Msmeg_0432 i Rv0260c wymagało amplifikacji genu *msmeg_0432* oraz *rv0260c* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Produkt PCR zawierający sekwencję kodującą białko Msmeg_0432 klonowano do wektora ekspresyjnego pMAL-c4E, umożliwiającego indukowaną ekspresję rekombinowanego białka w fuzji z MBP, będącym znacznikiem ułatwiającym oczyszczanie białka. Rekombinowanym plazmidem transformowano komórki Arctic Express (D3) *E. coli*, natomiast selekcja mutantów była możliwa dzięki obecności na wektorze genu warunkującego oporność na ampicylinę.

Amplifikacja genu *rv0260c* wymagała użycia specjalnych starterów, umożliwiających bezpośrednio wklonowanie genu do wektora ekspresyjnego. Produkt PCR zawierający sekwencję kodującą białko Rv0260c klonowano do wektora pSUMO, pozwalającego na indukowaną ekspresję rekombinowanego białka w fuzji z etykietą SUMO. Przygotowanym wektorem transformowano komórki BL21 (DE3) pLysS *E. coli*, a selekcji mutantów dokonywano na podłożu z kanamycyną.

4.29. Nadprodukcja, izolacja i oczyszczanie rekombinowanych białek

Warunki indukcji

Do przeprowadzenia zaplanowanych testów oraz zaszczepienia zwierząt w celu otrzymania przeciwciał, konieczne było uzyskanie preparatów rekombinowanych białek MBP-Msmeg_0432, His-Msmeg_5784 i SUMO-Rv0260c. Do oczyszczenia białka Msmeg_5784 wykorzystano szczep *E. coli* BL21 (DE3) pLysS zawierający plazmid pET28-a, pozwalający na indukowaną ekspresję tego białka w fuzji z etykietą His. Szczep ten został przygotowany przez dr Renatę Płocińską, w Instytucie Biologii Medycznej PAN.

Nadprodukcję białka MBP-Msmeg_0432 przeprowadzano w komórkach szczepu *E. coli* Arctic Express (D3), natomiast nadprodukcję białek His-Msmeg_5784 i SUMO-Rv0260c w *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Parametry indukcji takie jak temperatura, stężenie induktora i czas indukcji zostały zoptymalizowane na drodze doświadczalnej, w hodowlach na małą skalę o objętości 20 ml. Do izolacji białka na dużą skalę namnażano hodowle w objętości 500 ml.

Nadekspresja genów kodujących rekombinowane białka była prowadzona w podłożu LB wzbogaconym suplementami z dodatkiem odpowiednich antybiotyków: ampicyliną w przypadku białka MBP-Msmeg_0432 oraz kanamycyną i chloramfenikolem w przypadku białek His-Msmeg_5784 i SUMO-Rv0260c. Hodowle na dużą skalę zaszczepiano nocną hodowlą w stosunku 1:100 i prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem, do czasu osiągnięcia wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6-0,8$. Następnie, hodowle szczepu *E. coli* BL21 (DE3) schładzano do temperatury 20°C, a hodowle szczepu *E. coli* Arctic Express (D3) do 6°C, po czym do układów dodawano różnych ilości 1 M IPTG, będącego induktorem nadekspresji. Nadprodukcję białka MBP-Msmeg_0432 prowadzono w obecności IPTG o końcowym stężeniu w hodowli 0,4 mM, białka His-Msmeg_5784 przy stężeniu 1 mM, natomiast białka SUMO-Rv0260c przy stężeniu 0,2 mM. Indukowane hodowle inkubowano przez noc z wytrząsaniem, w temperaturach odpowiednio 20°C i 6°C. Po nocy, hodowle wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 4500 rpm, usuwano supernatanty, a osady komórek przechowywano w temperaturze -70°C. Oczyszczanie rekombinowanych białek przeprowadzano z osadu komórek z 1 litra hodowli.

Izolacja i oczyszczanie białek

Rekombinowane białka w fuzji ze znacznikiem MBP oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa, na kolumnach ze złożem amylozowym (BioLabs), natomiast białka w fuzji z etykietą His lub SUMO przy użyciu złoża niklowego HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific).

Izolację preparatów rekombinowanych białek rozpoczynano od dezintegracji komórek. Rozmrożony w łaźni lodowej osad komórek zawieszano w 10 ml buforu wiążącego, do którego dodawano PMSF i lizozym, do uzyskania końcowego stężenia odpowiednio 1 mM i 100 µg/ml. Zawiesinę komórek poddawano 10 cyklom (po 10 sekund) sonikacji sondą ultradźwiękową (Bioblok) z użyciem stopniowanej mikrokońcówki (LaboPlus). Ekstrakt komórkowy wirowano przez 40 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 16000 rpm, po czym supernatant przepuszczano przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 µm.

Kolumnę kalibrowano 25 ml buforu wiążącego, a następnie na złożę nakładano przefiltrowany supernatant, zbierając frakcje niezwiązanych ze złożem białek. Kolumnę płukano 100 ml buforu płuczającego, zachowując przesącz a rekombinowane białko eluowano buforem do elucji, zbierając 10 frakcji po 1 ml. Próbkę frakcji z różnych etapów oczyszczania oraz czystość rekombinowanego białka analizowano przy użyciu pionowej elektroforezy SDS-PAGE.

Doczyszczanie białek

Aby pozbyć się zanieczyszczeń obecnych w preparatach białek, uzyskane w pierwszym etapie oczyszczania frakcje białek łączono, następnie rozcieńczano w buforze do rozcieńczeń, tak aby stężenie końcowe NaCl w buforze, w którym znajdowało się białko było równe 50 mM. Przygotowaną w ten sposób mieszaninę nanoszono na kolumnę HiTrap SP FF, zainstalowaną w systemie AKTA start (GE Healthcare). Doczyszczanie przeprowadzano techniką chromatografii jonowymiennej, przy użyciu buforów A i B, według metody IEX step 1 ml HiTrap zaprogramowanej w urządzeniu, które samo wykonywało proces doczyszczania i elucji białek w gradiencie NaCl. Frakcje oczyszczonych białek zbierano w ilości 3 ml i analizowano przy użyciu pionowej elektroforezy SDS-PAGE.

Wymiana buforu białka

W celu pozbycia się imidazolu z buforu, w którym po oczyszczeniu znajdowały się niektóre białka, przy użyciu kolumny Sephadex G-25 dokonywano wymiany buforu. Kolumnę kalibrowano 25 ml buforu do kolumny Sephadex G-25, na skalibrowaną kolumnę nakładano 2,5 ml frakcji białka (przesącz zbierano), które następnie eluowano 3,5 ml buforu do kolumny Sephadex G-25.

Zatężanie białek

Wybrane frakcje białek uzyskane w wyniku oczyszczania zatężano na koncentratorach do białek Vivaspin® 6, 10 kDa MWCO (GE Healthcare), według zaleceń producenta.

4.30. Oznaczanie stężenia białka

Stężenia białek wyznaczano przy użyciu odczynnika Bradford Reagent (BioShop). Do 1 ml odczynnika dodawano po 10 µl wzorcowych roztworów BSA oraz badanych białek. Po 10 minutach inkubacji, przy użyciu spektrofotometru dokonywano pomiaru absorbancji roztworów, przy długości fali 595 nm wobec próby ślepej, którą stanowił sam odczynnik.

Wartości stężeń obliczano na podstawie równania krzywej wykreślonej dla wzorców BSA w programie Microsoft Excel.

4.31. Jednokierunkowa elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Do rozdziału białek o różnej masie cząsteczkowej stosowano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Próbkę do elektroforezy przygotowano poprzez dodanie do nich buforu do obciążania (4×stężonego) i denaturację przez 5 minut w temperaturze 98°C. Przygotowane próbki nakładano na żel poliakrylamidowy wobec markera wielkości białek, a rozdzielanie elektroforetyczne prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze TGB przy napięciu prądu 140 V, do czasu całkowitego usunięcia barwnika z żelu. Po zakończonym rozdzielaniu żel płukano w wodzie destylowanej i barwiono barwnikiem do żeli białkowych Instant Blue (Expedeon).

4.32. Immunodetekcja metodą western blot

Analizę western blot rozpoczynano rozdzielaniem elektroforetycznym białek (Metody 4.31) pomijając etap barwienia żelu. W kolejnym etapie dokonywano elektrotransferu białek z żelu na membranę PVDF. W aparacie do elektrotransferu od strony elektrody dodatniej układano w następującym porządku: gąbkę, 3 bibuły Whatman w rozmiarze żelu, żel poliakrylamidowy, nasączoną metanolem membranę w rozmiarze żelu, 3 bibuły Whatman oraz gąbkę, upewniając się, że pomiędzy żelem a membraną nie powstały pęcherzyki powietrza. Elektrotransfer prowadzono przez noc w buforze do transferu, w temperaturze 4°C, przy natężeniu prądu 50 mA.

Po zakończonym transferze, membranę przenoszono do czystej kuwety, do której następnie wlewano bufor blokujący i inkubowano na kołyszce laboratoryjnej przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie bufor blokujący wylewano, natomiast do kuwety dodawano 10 ml rozcieńczonych przeciwciał pierwszorzędowych, z którymi inkubowano membranę przez kolejne 1,5 godziny na kołyszce laboratoryjnej, w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie przeciwciała niezwiązane z białkiem odpłukano poprzez sześciokrotne płukanie membrany buforem TBS-T, każde po 5 minut. Następnie do kuwety dodawano 10 ml rozcieńczonych przeciwciał drugorzędowych, z którymi inkubowano membranę na kołyszce laboratoryjnej, przez 1,5 godziny, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji niezwiązane przeciwciała odpłukiwano buforem TBS-T poprzez sześciokrotne płukanie membrany przez 5 minut. Na odsączoną membranę nanoszono substrat dla peroksydazy,

z którym inkubowano membranę przez 2 minuty. Po tym czasie membranę wkładano do przezroczystej folii, umieszczano w kasecie rentgenowskiej, następnie w ciemności na membranę nakładano kliszę rentgenowską. Ekspozycję prowadzono przez 1 minutę, po której kliszę wywoływano w automatycznej wywoływarce Medical X-ray Processor (Kodak).

4.33. Badanie oddziaływań między białkami metodą Pull-down

Do analizy oddziaływań między białkami wykorzystano technikę opartą o chromatografię powinowactwa, w której do kulek magnetycznych immobilizuje się białko wykazujące do nich powinowactwo. W kolejnym etapie dodawane jest drugie białko, nieposiadające powinowactwa do kulek magnetycznych. O oddziaływaniu cząsteczek świadczy obecność w eluatach obu badanych białek.

Do analizy przygotowywano po 5 nM białek zawieszonych w buforze do wiązania w objętości 500 μ l, zachowując 16 μ l. Do próbek typu Eppendorf dodawano ilość kulek magnetycznych HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific) zdolną do związania całości białka wykazującego powinowactwo do złoża. Kulki magnetyczne trzykrotnie płukano 1 ml buforu do płukania, po czym do złoża dodawano 484 μ l rekombinowanego białka z etykietą His, zawieszzonego w buforze do wiązania. Po 1 godzinie inkubacji na rotorze, w temperaturze 4°C, na separatorze magnetycznym zbierano frakcję niezwiązanego białka. Następnie, złożo płukano 1 ml buforu do płukania i dodawano 484 μ l rekombinowanego białka partnerskiego, niewykazującego powinowactwa do kulek magnetycznych, zachowując 16 μ l. Po 1 godzinnej inkubacji na rotorze w temperaturze 4°C, na separatorze magnetycznym usuwano frakcje niezwiązanego białka, po czym złożo płukano sześciokrotnie 1ml buforu do płukania. W ostatnim etapie dokonywano elucji białek w 70 μ l buforu do elucji (bufor do oczyszczania białek z metką His). Kontrolę eksperymentu stanowiło oddziaływanie białka immobilizowanego do kulek magnetycznych z BSA. Frakcje z różnych etapów analizy rozdzielano elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

4.34. Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowych mykobakterii

Hodowle szczepów prowadzono w warunkach określonych dla danego eksperymentu i w odpowiednich punktach pomiarowych wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 14500 rpm. Osad komórek zawieszano w 200 μ l buforu TE, zawiesinę przenoszono do nowej próbówki typu Eppendorf, do której następnie dodawano 2 krople kulek cyrkonioowych o średnicy 0,1 mm. Komórki homogenizowano przez 45 sekund, przy

użyciu urządzenia Mini Beadbeater-8 (BioSpec Products), po czym do zawiesiny dodawano 10% SDS, do uzyskania końcowego stężenia 2%. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 55°C a następnie wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 14500 rpm. Supernatant stanowiący ekstrakt rozpuszczalnych białek przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

4.35. Analiza oddziaływań białek z DNA metodą EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Technika EMSA jest metodą polegającą na uzyskaniu kompleksów białek z DNA oraz ich elektroforetycznym rozdziale zważywszy na fakt, że kompleksy białek z DNA migrują w żelu wolniej niż niezwiązany DNA. Analizę tę wykonano wykorzystując komercyjny zestaw LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific), zgodnie z wytycznymi producenta. Do testu używano znakowane heksachlorofluoresceiną fragmenty DNA amplifikowane przy użyciu specjalnych starterów. Rozdział cząsteczek prowadzono w 2% żelu agarazowym w 0,25×stężonym buforze TBE, przy napięciu prądu 70 V i w temperaturze 4°C, przez 2 godziny. Wizualizacji kompleksów białek z DNA dokonywano z wykorzystaniem urządzenia Typhoon 8600 Imager Scanner (GE Healthcare).

4.36. Monitorowanie wzrostu szczepów *Mycobacterium* – pomiar gęstości optycznej (OD₆₀₀) oraz określenie liczby żywych komórek (CFU – ang. colony forming unit)

Hodowle szczepu dzikiego oraz badanych mutantów *M. smegmatis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 20 ml, z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6 – 0,8. Hodowle te służyły do zaszczepiania nowych porcji podłoża, o współczynniku gęstości optycznej OD₆₀₀=0,1. Przygotowane w ten sposób nowe hodowle prowadzono w temperaturze 37°C z wytrząsaniem, przez okres czasu przewidziany w danym eksperymencie. Wzrost komórek monitorowano poprzez pomiar współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀, natomiast w niektórych przypadkach z hodowli pobierano 1 ml, wykonywano szereg rozcieńczeń i wysiewano po 100 µl na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC. Płytki te inkubowano w temperaturze 37°C, przez około 72 godziny.

Hodowle szczepu dzikiego oraz badanych mutantów *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6 – 0,8. Hodowlami tymi zaszczepiano nowe porcje podłoża, do uzyskania współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,1.

Przygotowane hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez czas określony w danym eksperymencie. Dalsze etapy polegające na ocenie wzrostu komórek oraz przeżywalności szczepów *M. tuberculosis* przeprowadzono w sposób analogiczny, jak w przypadku szczepów *M. smegmatis*, z wydłużonym czasem inkubacji płytek do 3 tygodni.

4.37. Analiza wrażliwości mykobakterii na DETA-NO i menadion za pomocą techniki CFU

Hodowle szczepu dzikiego i badanych szczepów mutantów *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6 - 0,8$. Hodowle te służyły do zaszczepienia nowych porcji podłoża Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,1$. Do przygotowanych hodowli dodawano badane związki w odpowiednim stężeniu, natomiast kontrole eksperymentu stanowiły hodowle badanych szczepów w podłożu Middlebrook 7H9/OADC. Hodowle inkubowano w temperaturze 37°C przez 11 dni, monitorując wzrost i przeżywalność bakterii tak jak opisano w rozdziale Metody 4.36.

4.38. Analiza wrażliwości mykobakterii na wybrane antybiotyki oraz inne związki testem kropkowym na podłożu stałym

Hodowle szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6 - 0,8$. Następnie hodowle rozcieńczano w podłożu do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,5$ po czym wykonywano szereg rozcieńczeń i наносzono po 5 μ l na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC zawierające badane związki w odpowiednich stężeniach. Kontrolę eksperymentu stanowiło samo podłoże Middlebrook 7H10/OADC. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez około 3 tygodnie.

4.39. Analiza wrażliwości mykobakterii na wybrane antybiotyki oraz inne związki metodą Microplate Alamar Blue Assay

Oceny wrażliwości szczepu dzikiego i badanych mutantów *M. tuberculosis* na antybiotyki oraz inne substancje dokonywano na 96-dołkowych płytkach, w których wykonywano szereg rozcieńczeń badanego związku. Metoda Microplate Alamar Blue Assay opiera się na analizie kolorymetrycznej hodowli po dodaniu niebiesko zabarwionej

rezazuryny przyjmując, że żywe komórki są zdolne do redukcji tego związku do różowej rezorufiny.

Hodowle szczepów *M. tuberculosis* prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9/OADC w objętości 10 ml, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600}=0,6 - 0,8$. Hodowle te rozcieńczano w podłożu Middlebrook 7H9/OADC-S, do uzyskania gęstości komórek 1 w skali McFarland, a następnie rozcieńczano dziesięciokrotnie w tym samym podłożu. Tak przygotowaną zawiesinę komórek nakładano po 100 μ l na 96-dołkową płytkę, zawierającą po 100 μ l podłoża Middlebrook 7H9/OADC-S z różnymi stężeniami badanych inhibitorów. Kontrolę testu stanowiło samo podłoże Middlebrook 7H9/OADC-S, podłoże z dodatkiem badanych związków oraz hodowle badanych szczepów bez dodatku czynnika hamującego. Płytkę z mikrohodowlami inkubowano przez 7 dni w temperaturze 37°C, a po tym czasie do każdego dołka dodawano po 30 μ l 0,02% rezazuryny. Sprawdzano także jałowość samego odczynnika. Po 48 godzinnej inkubacji w ciemności w temperaturze 37°C, analizie poddawano kolor hodowli.

4.40. Analiza statystyczna

Istotność statystyczną uzyskanych wyników określano za pomocą programu Sigma Plot 14.0.

5. Wyniki

5.1. Przygotowanie modeli genetycznych pozwalających na analizę niezbędności genów *rv0195*, *rv0260c* i *msmeg_0432* w komórkach mykobakterii

Weryfikację niezbędności genów w komórkach mykobakterii można badać z zastosowaniem metody opartej o rekombinację homologiczną. Technika ta pozwala na uzyskanie mutantów typu SCO noszących gen natywny oraz gen niefunkcjonalny, wprowadzony na drodze rekombinacji. Mutanty SCO mogą podlegać kolejnej rekombinacji, w wyniku której otrzymuje się mutanty DCO. Noszą one wyłącznie gen funkcjonalny (typu dzikiego - wtDCO) lub inaktywowany (typu zmutowanego - mutDCO). Uzyskanie mutantu mutDCO, bez wprowadzenia dodatkowej, funkcjonalnej kopii genu jest możliwe jedynie, kiedy badany gen nie jest wymagany do wzrostu komórek prątków.

W niniejszej pracy analizie niezbędności poddano geny *rv0195* i *rv0260c* w komórkach *M. tuberculosis* oraz gen *msmeg_0432* w komórkach *M. smegmatis*, będący homologiem genu *rv0260c* u szybko rosnących prątków.

5.1.1. Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej

Konstrukcję wektorów do rekombinacji homologicznej rozpoczynano amplifikacją fragmentów genów *rv0195*, *rv0260c* i *msmeg_0432* oraz sekwencji je flankujących na matrycy chromosomalnego DNA *M. tuberculosis* (geny *rv0195* i *rv0260c*) i *M. smegmatis* (gen *msmeg_0432*), przy użyciu oligonukleotydów przedstawionych w rozdziale Materiały 3.2., w Tabeli 3.2. Wielkości amplifikowanych fragmentów przedstawiono w Tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Wielkości wewnętrznych delecji oraz fragmentów genów wykorzystanych do konstrukcji wektorów do rekombinacji homologicznej wraz z enzymami rozpoznającymi sekwencje i nazwami plazmidów pośrednich.

Klonowana sekwencja	Wielkość fragmentu	Enzymy wykorzystane do klonowania	Nazwa plazmidu po ligacji fragmentu z wektorem pJET 1.2	Wielkość wewnętrznej delecji
Fragment 5' genu <i>msmeg_0432</i> z sekwencją „powyżej” genu	1560 pz	ScaI i HindIII	pMA1	460 pz
Fragment 3' genu <i>msmeg_0432</i> z sekwencją „poniżej” genu	1396 pz	HindIII i KpnI	pMA2	
Fragment 5' genu <i>rv0260c</i> z sekwencją „powyżej” genu	1616 pz	ScaI i HindIII	pMA9	568 pz
Fragment 3' genu <i>rv0260c</i> z sekwencją „poniżej” genu	1254 pz	HindIII i KpnI	pMA10	
Fragment 5' genu <i>rv0195</i> z sekwencją „powyżej” genu	911 pz	KpnI i HindIII	pMA17	325 pz
Fragment 3' genu <i>rv0195</i> z sekwencją „poniżej” genu	1270 pz	HindIII i ScaI	pMA18	

Produkty PCR poddawano niezależnej ligacji z wektorem pJET 2.1, a uzyskane plazmidy weryfikowano restrykcyjnie poprzez trawienia odpowiednimi endonukleazami oraz sekwencjonowanie DNA metodą Sangera. Uzyskanym rekombinowanym wektorom nadawano nazwy przedstawione w Tabeli 5.1.

Przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych (Tabela 5.1.) fragmenty 5' badanych genów wycinano z plazmidów pMA1, pMA9, pMA17 i wprowadzano do wektora p2NIL uzyskując rekombinowane plazmidy pMA3, pMA11 i pMA19. W kolejnym etapie wprowadzano do nich fragmenty 3' badanych genów, które wycinano z plazmidów pMA2, pMA10 i pMA18, za pomocą odpowiednich restryktaz (Tabela 5.1.). Uzyskane wektory pMA4, pMA12 i pMA20 charakteryzowały się obecnością niefunkcjonalnych genów z wewnętrzną delecją oraz fragmentów je „oskrzydlających”.

W ostatnim etapie, przy użyciu endonukleazy PacI z wektora pGOAL17 wycinano kasetę markerową niosącą geny *sacB* oraz *lacZ* i klonowano w unikalne miejsce PacI plazmidów pMA4, pMA12 i pMA20. Tak przygotowane wektory do homologicznej rekombinacji, niosące fragmenty DNA flankujące inaktywowane geny *msmeg_0432*, *rv0260c* i *rv0195* wraz z kasetą markerową nazwano pMA5, pMA13 i pMA21.

Wieloletni przebieg konstrukcji wektorów do homologicznej rekombinacji przedstawiono w rozdziale Metody 4.17. na Rycinie 4.1.

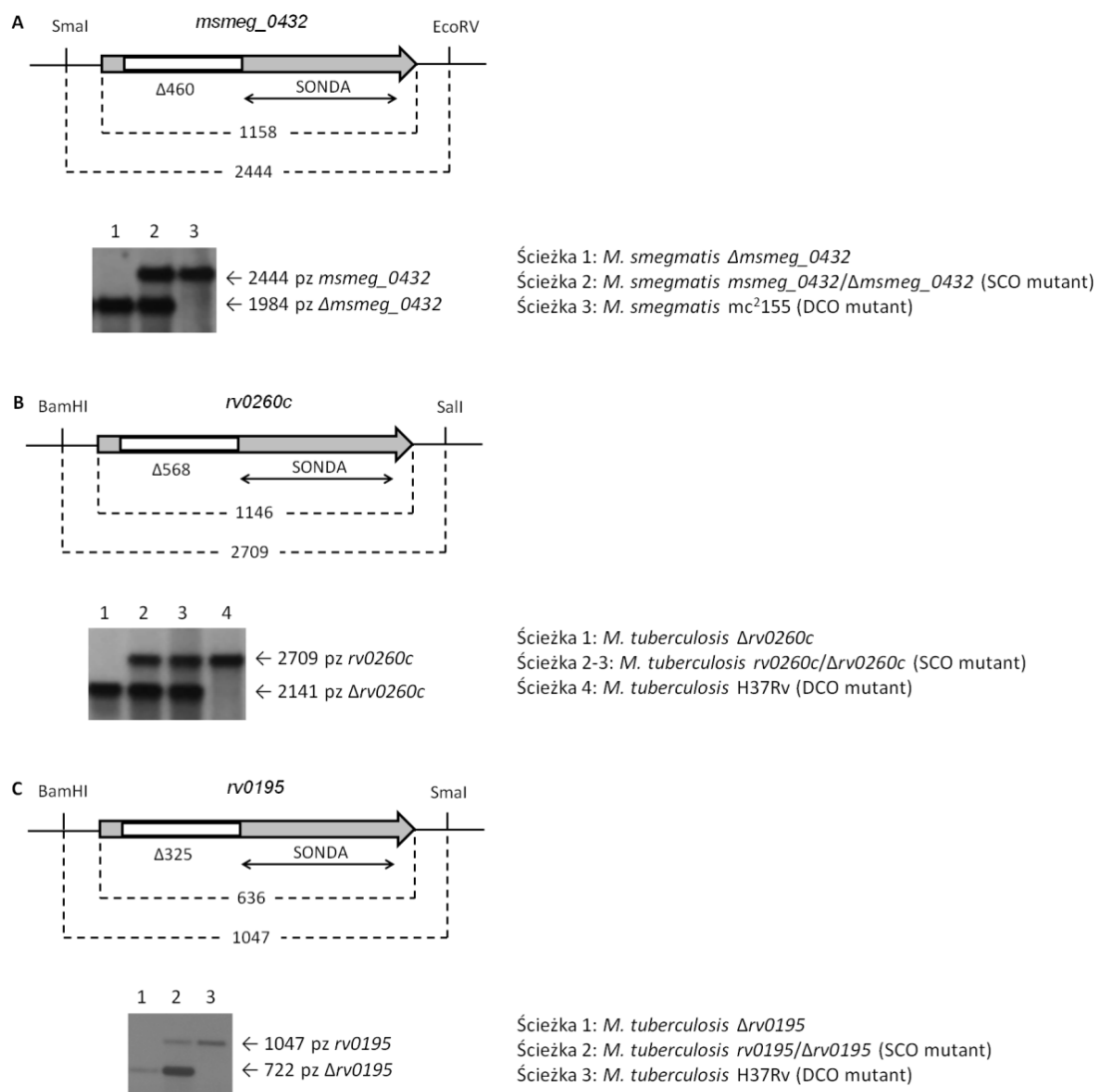
5.1.2. Konstrukcja ukierunkowanych mutantów

Uzyskane plazmidy rekombinacyjne nie posiadają miejsca inicjacji replikacji u mykobakterii, zatem wprowadzone do komórek prątków ulegają degradacji bądź integracji do chromosomalnego DNA w procesie rekombinacji, w obrębie homologicznej sekwencji. Tak uzyskane rekombinowane szczepy charakteryzują się opornością na kanamycynę, zdolnością do rozkładu X-gal oraz wrażliwością na 2% sacharozę.

Uzyskane rekombinowane szczepy SCO o pożądanym fenotypie (*msmeg_0432/Δmsmeg_0432 M. smegmatis* oraz *rv0260c/Δrv0260c* i *rv0195/Δrv0195 M. tuberculosis*) weryfikowano na poziomie genetycznym poprzez reakcję PCR na matrycy izolowanego DNA, z wykorzystaniem oligonukleotydów rozpoznających sekwencje 5' i 3' badanych genów (Tabela 3.2.). Jako kontrolę przeprowadzono reakcje amplifikacji na matrycy wektora do rekombinacji homologicznej oraz chromosomalnego DNA szczepu dzikiego, z użyciem tych samych oligonukleotydów. Uzyskane wyniki wskazujące na obecność zarówno genu typu dzikiego jak i zawierającego wewnętrzną delecję potwierdziły zajście homologicznej rekombinacji w komórkach uzyskanych szczepów.

Uzyskane mutanty SCO namnażano na podłożu stałym, po czym prowadzono selekcję w kierunku mutantów, u których w wyniku rekombinacji doszło do utraty sekwencji plazmidu i pozostawienia dzikiej lub нефunkcjonalnej kopii badanych genów. Mutanty takie charakteryzowały się wrażliwością na kanamycynę, opornością na 2% sacharozę oraz brakiem zdolności do rozkładu X-gal. Genotypy uzyskanych rekombinantów były weryfikowane poprzez amplifikację badanych genów oraz hybrydyzację typu Southern blot (Metody 4.21.).

W tym celu, chromosomalny DNA izolowany z uzyskanych transformantów, trawiono restrykcyjnie z wykorzystaniem odpowiednich endonukleaz (*Δmsmeg_0432 M. smegmatis* / SmaI i EcoRV; *Δrv0260c* i *Δrv0195 M. tuberculosis* / BamHI i SalI oraz BamHI i SmaI), rozdzielano w żelu agarozowym, poddawano transferowi na membranę nylonową oraz hybrydyzowano z sondami genetycznymi uzyskanymi w wyniku amplifikacji 5' fragmentów badanych genów. Jako kontrole zastosowano chromosomalny DNA szczepów dzikich *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis*. Wyniki analizy potwierdziły genotypy mutantów DCO *Δmsmeg_0432 M. smegmatis* oraz *Δrv0260c* i *Δrv0195 M. tuberculosis*, pozwalając stwierdzić, że inaktywacja badanych genów nie jest letalna dla mykobakterii (Rycina 5.1.).



Rycina 5.1. Potwierdzenie genotypów uzyskanych mutantów *M. smegmatis* (A) i *M. tuberculosis* (B, C). Górna część paneli (A), (B) i (C) przedstawia graficzny schemat trawienia restrykcyjnego genomowego DNA wyizolowanego z badanych szczepów oraz wielkości wewnętrznych delecji. Dolna część paneli (A), (B) i (C) przedstawia wyniki analizy Southern blot z użyciem trawionego chromosomalnego DNA.

Do dalszych badań włączono także szczep Δ *msmeg_5784* *M. smegmatis* pozbawiony zdolności do syntezy białka regulatorowego *Msmeg_5784*, który został skonstruowany przez dr Renatę Płocińską w Instytucie Biologii Medycznej PAN, według protokołu wykorzystywanego w niniejszej pracy.

5.1.3. Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów typu DCO

Konstrukcja wektorów do komplementacji uzyskanych mutantów była procesem wieloetapowym, opisanym szczegółowo w rozdziale Metody 4.20. oraz zobrazowanym na Rycinie 4.4. Uzyskane wektory transformowano do mutantów DCO drogą elektroporacji a ich integrację potwierdzano w reakcji PCR.

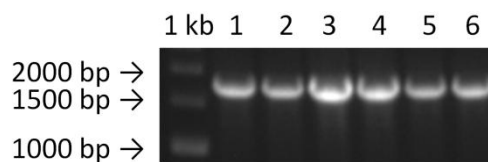
Aby uzyskać wektory integracyjne do komplementacji mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* oraz $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis*, przeprowadzano niezależną amplifikację genów *msmeg_0432* i *rv0260c* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, z użyciem odpowiednich oligonukleotydów starterowych (Tabela 3.2.). Uzyskane produkty amplifikacji dla poszczególnych genów klonowano w wektorze pJET 1.2, a po weryfikacji ich sekwencji (sekwencjonowanie metodą Sanger) przeklonowano do wektora pMV261 (BglII/HindIII w miejsca BamHI/HindIII) poniżej sekwencji promotora *P_{hsp60}*. W kolejnym etapie sekwencję genu wraz z sekwencją promotora przenoszono (XbaI-HindIII) do wektora integracyjnego pMV306Km. Uzyskane na bazie pMV306Km plazmidy komplementacyjne niosące badane geny *msmeg_0432* i *rv0260c* pod kontrolą promotora *P_{hsp60}* nazwano pMA8 i pMA16.

Konstrukcję wektora do komplementacji mutantu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* rozpoczynano amplifikacją genu *rv0195* wraz z sekwencją potencjalnego promotora, na matrycy genomowego DNA *M. tuberculosis*, z wykorzystaniem odpowiednich oligonukleotydów (Tabela 3.2.). Produkt PCR klonowano w wektorze pJET 1.2, weryfikowano poprzez sekwencjonowanie i przenoszono z wykorzystaniem endonukleaz XbaI i HindIII do wektora pMV306Km. Uzyskany plazmid komplementacyjny zawierający gen *rv0195* pod kontrolą własnej sekwencji promotorowej nazwano pMA23.

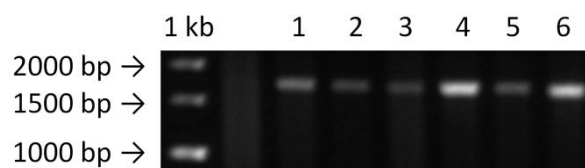
Otrzymane plazmidy komplementacyjne wprowadzano poprzez elektrotransformację do komórek kompetentnych mutantów DCO mykobakterii pozbawionych funkcjonalnych genów. W wyniku transformacji dochodziło do integracji plazmidu w miejsce *attB* obecne w DNA chromosomalnym oraz nabycia cech kodowanych przez geny wprowadzone do komórki. W efekcie, mutanty były zdolne do ekspresji genów, które utraciły w procesie podwójnej rekombinacji homologicznej. Selekcja mutantów posiadających integrowany wektor była możliwa dzięki ekspresji genu nadającego oporność na kanamycynę.

Wektor integracyjny pMA8 wprowadzano do komórek kompetentnych mutantu DCO $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis*, wektor pMA16 do mutantu DCO $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis*, natomiast wektor pMA23 do mutantu DCO $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis*.

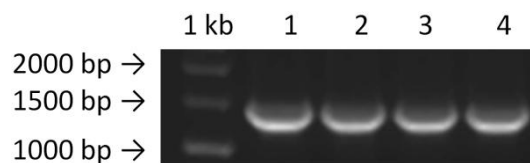
Selekcji mutantów dokonano na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC z kanamycyną, natomiast uzyskany genotyp potwierdzono w reakcji PCR na matrycy genomowego DNA (Rycina 5.2., Rycina 5.3., Rycina 5.4.), z wykorzystaniem odpowiednich oligonukleotydów (Tabela 3.2.).



Rycina 5.2. Analiza elektroforetyczna produktów PCR uzyskanych na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów (1-3) $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\textit{phspmsmeg_0432}$ i (4-5) $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\textit{phspmsmeg_0432}$ oraz (6) wektora integracyjnego pMA8, z wykorzystaniem oligonukleotydów potwierdzających integrację wektora pMV306Km.



Rycina 5.3. Analiza elektroforetyczna produktów PCR uzyskanych na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepu (1-5) $\Delta rv0260c\text{-attB}::\textit{phsp}rv0260c$ oraz (6) wektora integracyjnego pMA16, z wykorzystaniem oligonukleotydów potwierdzających integrację wektora pMV306Km.

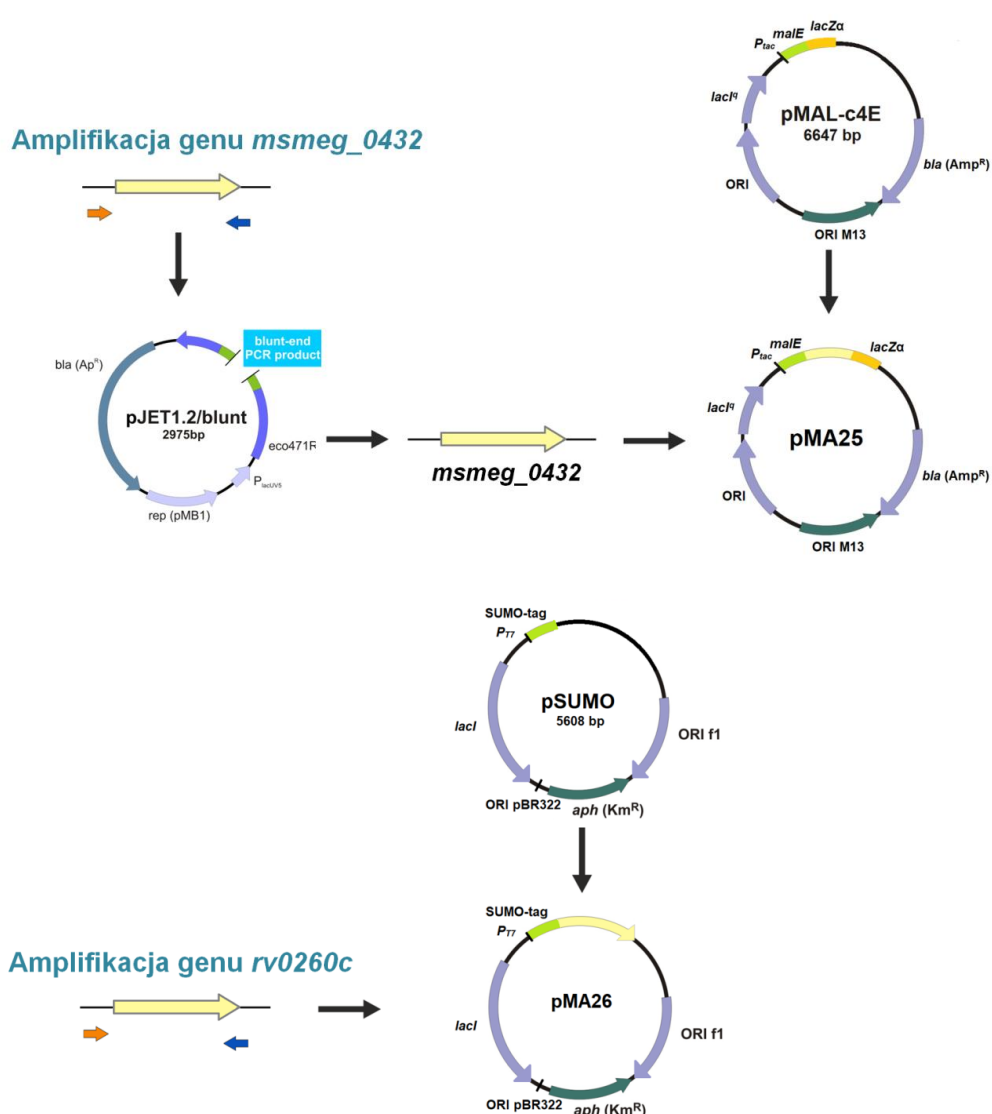


Rycina 5.4. Analiza elektroforetyczna produktów PCR uzyskanych na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepu (1-3) $\Delta rv0195\text{-attB}::\textit{prv0195}rv0195$ oraz (4) wektora integracyjnego pMA23, z wykorzystaniem oligonukleotydów potwierdzających integrację wektora pMV306Km.

5.2. Przygotowanie systemów ekspresyjnych do nadprodukcji i oczyszczania rekombinowanych białek Msmeg_0432 i Rv0260c

5.2.1. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych zdolnych do nadprodukcji rekombinowanych białek Msmeg_0432 i Rv0260c

Do nadprodukcji rekombinowanych białek stosowano wektory pozwalające na indukowaną ekspresję białek w komórkach *E. coli*. Rekombinowane białko Msmeg_0432 w fuzji z MBP uzyskiwano przy użyciu wektora pMAL-c4E, natomiast do nadprodukcji białka Rv0260c ze znacznikiem SUMO wykorzystywano plazmid pSUMO. Etapy konstrukcji wektorów ekspresyjnych przedstawiono na Rycinie 5.5.



Rycina 5.5. Schemat konstrukcji wektorów do nadprodukcji białek MBP-Msmeg_0432 i SUMO-Rv0260c w komórkach *E. coli*.

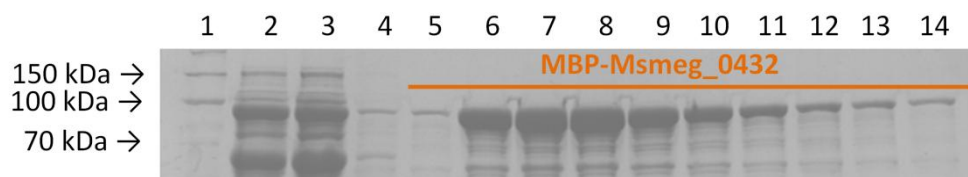
Przygotowanie wektorów do ekspresji białek wymagało niezależnej amplifikacji genu *msmeg_0432* oraz *rv0260c* na matrycy genomowego DNA *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, przy użyciu odpowiednich oligonukleotydów (Tabela 3.2.). Produkt amplifikacji genu *msmeg_0432* klonowano w wektorze pJET 1.2, sekwencjonowano a następnie przeklonowano do wektora ekspresyjnego z użyciem endonukleaz KpnI i HindIII. Konstrukt pMAL-c4E niosący gen *msmeg_0432* nazwano pMA25.

Amplifikowaną sekwencję genu *rv0260c* klonowano bezpośrednio do wektora pSUMO trawionego endonukleazami BamHI i BsaI, sekwencjonowano a uzyskany rekombinowany plazmid ekspresyjny nazwano pMA26.

Skonstruowany plazmid pMA25 wprowadzano do opornych na gentamycynę komórek *E. coli* Arctic Express (D3), natomiast pMA26 do opornych na chloramfenikol komórek *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Obecność wektora w komórkach potwierdzano elektroforetycznie. Uzyskane szczepy ekspresyjne oraz obecny w laboratorium szczep *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, pozwalający na indukowaną ekspresję rekombinowanego białka Msmeg_5784 w fuzji ze znacznikiem histydynowym (skonstruowany w oparciu o wektor pET28-a) wykorzystywano do nadprodukcji rekombinowanych białek.

5.2.2. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek Msmeg_0432, Msmeg_5784 i Rv0260c

Nadprodukcję białek MBP-Msmeg_0432, His-Msmeg_5784 i SUMO-Rv0260c w systemach ekspresji *E. coli*, dezintegrację komórek oraz oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa przeprowadzano w sposób opisany w rozdziale Metody 4.29. Parametry indukcji nadekspresji genów kodujących białka optymalizowano indywidualnie na drodze doświadczalnej, w hodowlach na małą skalę. Rekombinowane białko Msmeg_0432 w fuzji z MBP oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa z użyciem złoża amylozowego, natomiast białka Msmeg_5784 i Rv0260c oczyszczano na złożu HisPur Ni-NTA, ze względu na obecność w ich strukturze etykiety histydynowej. Frakcje pobierane na poszczególnych etapach oczyszczania analizowano w elektroforezie SDS-PAGE (Rycina 5.6., Rycina 5.7., Rycina 5.8.).



Rycina 5.6. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka MBP-Msmeg_0432 w 12% żelu poliakrylamidowym: (1) wzorzec mas cząsteczkowych, (2) rozpuszczalna frakcja lizatu komórkowego po sonikacji, (3) frakcja białek niezwiązanych do złoża, (4) frakcja pochodząca z płukania złoża, (5-14) frakcje po elucji ze złoża.



Rycina 5.7. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka His-Msmeg_5784 w 12% żelu poliakrylamidowym: (1) wzorzec mas cząsteczkowych, (2) rozpuszczalna frakcja lizatu komórkowego po sonikacji, (3-13) frakcje po elucji ze złoża.

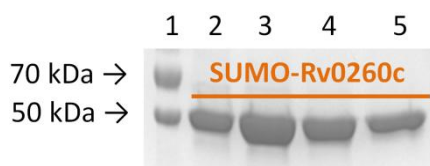


Rycina 5.8. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka SUMO-Rv0260c w 12% żelu poliakrylamidowym: (1) wzorzec mas cząsteczkowych, (2) rozpuszczalna frakcja lizatu komórkowego po sonikacji, (3) frakcja białek niezwiązanych do złoża, (4) frakcja pochodząca z płukania złoża, (5-14) frakcje po elucji ze złoża.

Ze względu na niezadawalającą jakość preparatów rekombinowanych białek MBP-Msmeg_0432 oraz SUMO-Rv0260c, eluaty po oczyszczaniu na odpowiednich złożach rozcieńczano i doczyszczano z użyciem systemu AKTA start, według procedury opisanej w rozdziale Metody 4.29. Eluaty z drugiego etapu oczyszczania analizowano metodą elektroforezy SDS-PAGE (Rycina 5.9., Rycina 5.10.).



Rycina 5.9. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas doczyszczania białka MBP-Msmeg_0432 w 12% żelu poliakrylamidowym: (1) wzorzec mas cząsteczkowych, (2-6) frakcje po elucji ze złoża.



Rycina 5.10. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas doczyszczania białka SUMO-Rv0260c w 12% żelu poliakrylamidowym: (1) wzorzec mas cząsteczkowych, (2-5) frakcje po elucji ze złoża.

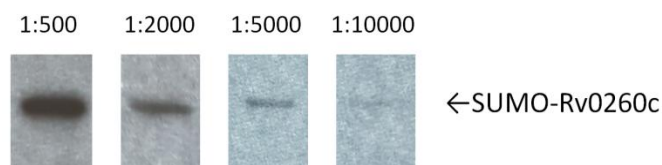
Wybrane eluaty białek MBP-Msmeg_0432 i SUMO-Rv0260c oczyszczonych w dwóch etapach oraz frakcje białka His-Msmeg_5784 po wymianie buforu (kolumna Sephadex G-25) zatężano na koncentratorach do białek Vivaspin® 6, 10 kDa MWCO (GE Healthcare). Następnie oznaczano stężenia uzyskanych preparatów metodą Bradforda (Metody 4.30.). Z jednego oczyszczania uzyskiwano około 3 mg rekombinowanego białka MBP-Msmeg_0432, około 2 mg białka SUMO-Rv0260c oraz około 4 mg białka His-Msmeg_5784.

Zastosowane systemy ekspresyjne pozwoliły na wydajną nadprodukcję rekombinowanych białek i ich efektywne oczyszczanie z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa. Białko SUMO-Rv0260c posłużyło do zaszczepienia zwierząt laboratoryjnych, w celu uzyskania surowicy odpornościowej skierowanej przeciwko białku SUMO-Rv0260c. Preparaty białek MBP-Msmeg_0432 oraz His-Msmeg_5784 wykorzystano do badania oddziaływań między białkami metodą Pull-down oraz do analizy oddziaływań białek z DNA techniką EMSA.

5.3. Analiza uzyskanych poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białku SUMO-Rv0260c

Rekombinowane białko SUMO-Rv0260c wykorzystano jako antygen do immunizacji myszy. Surowicę zawierającą poliklonalne przeciwciała anty-SUMO-Rv0260c uzyskano we

współpracy z Katedrą Immunologii i Parazytologii Uniwersytetu Łódzkiego. W celu sprawdzenia swoistości otrzymanej surowicy przeprowadzono immunodetekcję metodą western blot (Metody 4.32.) z wykorzystaniem białka SUMO-Rv0260c oraz poliklonalnych przeciwciał rozcieńczonych w różnych proporcjach. Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 5.11.



Rycina 5.11. Analiza western blot oczyszczonego rekombinowanego białka SUMO-Rv0260c (0,6 µg) z użyciem mysich poliklonalnych przeciwciał anti-SUMO-Rv0260c rozcieńczonych w różnych proporcjach.

Immunodetekcja techniką western blot potwierdziła, że uzyskane przeciwciała swoiście rozpoznają rekombinowane białko SUMO-Rv0260c. Badanie pozwoliło także określić optymalne rozcieńczenie przeciwciał (1:2000), które w dalszej części pracy wykorzystywano do oceny poziomu białka Rv0260c w badanych szczepach.

5.4. Analiza mutantu Δ msmeg_0432 *M. smegmatis* z wykorzystaniem macierzy fenotypowych

Wstępną charakterystykę szczepu Δ msmeg_0432 *M. smegmatis* przeprowadzono z użyciem macierzy fenotypowych w systemie BIOLOG we współpracy z dr Anną Żaczek (Uniwersytet Rzeszowski). Przygotowane w odpowiedni sposób hodowle szczepu dzikiego oraz szczepu mutantu nanoszono na 96-studzienkowe, komercyjne płytki zawierające różne związki stanowiące źródła węgla i azotu bądź związki potencjalnie hamujące wzrost bakterii (Metody 4.27). Analizy fenotypowej dokonywano w oparciu o porównanie kinetyki aktywności metabolicznej w testowanych warunkach porównując pola powierzchni pod wykresami (AUC) dla badanego mutantu i szczepu kontrolnego. Ze względu na obszerne obliczenia, wyniki analizy przedstawiono w Pliku 5.1. na płycie CD załączonej do pracy.

Szczep dziki oraz szczep Δ msmeg_0432 hodowany w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC testowano w ponad 1900 warunkach wzrostu. Komórki hodowano między innymi w obecności antybiotyków, organicznych i nieorganicznych źródeł węgla i azotu oraz innych związków wpływających na ścianę komórkową, procesy osmotyczne, syntezę kwasów

nukleinowych i wiele innych. Poszczególne studzienki na płycie różniły się stężeniami substancji, ich kombinacją lub wartością pH komercyjnego podłoża z badanymi związkami.

W wielu warunkach wzrostu zaobserwowano zmienioną aktywność metaboliczną mutantu Δ *msmeg_0432*, w stosunku do szczepu dzikiego. Komórki tego szczepu wykazywały mniejszą wrażliwość między innymi na chloroksylenol, wankomycynę, plumbaginę czy amikacynę. Co ciekawe, mutant charakteryzował się szybszym tempem wzrostu w obecności aminokwasów przy wartości pH podłoża równiej 9,5 oraz 4,5. Z kolei słabszy wzrost mutantu Δ *msmeg_0432* obserwowano w obecności między innymi 8-hydroksychinoliny, chlorku cynku, chlorku kadmu, patuliny i hydroksyloaminy.

Hodowle szczepu dzikiego oraz mutantu Δ *msmeg_0432*, w których przed analizą indukowano głód azotowy wykorzystano do testu na płytkach zawierających związki azotu. Badanie pozwoliło ocenić zdolność szczepu do asymilacji azotu pochodzącego z aminokwasów, peptydów, pirymidyn, nukleozydów oraz innych nieorganicznych i organicznych związków azotowych. Z przeprowadzonej analizy wynika, że mutant Δ *msmeg_0432* wykazuje mniejszą aktywność metaboliczną w stosunku do szczepu dzikiego, w obecności takich źródeł azotu jak guanozyna (różnica AUC >9500), azotyn (>8500), cytozyna (>8000), kwas γ -aminomasłowy (>7500), glukuronamid (>7000) oraz azotan (>6500).

5.5. Globalna analiza transkryptomyczna mutantu Δ *msmeg_0432* oraz Δ *msmeg_5784* *M. smegmatis* w warunkach głodu azotowego

Dane literaturowe (Jenkins i wsp., 2013) wskazują, że u *M. smegmatis* ekspresja genu *msmeg_0432* jest indukowana w warunkach głodu azotowego i podlega bezpośredniej regulacji przez białko *Msmeg_5784*, będące głównym regulatorem metabolizmu azotu u mykobakterii. Analiza mikromacierzy fenotypowych przeprowadzona dla mutantu Δ *msmeg_0432* wykazała, że badany szczep charakteryzuje się słabszą aktywnością metaboliczną w obecności niektórych źródeł azotu, w porównaniu do szczepu kontrolnego. Aby poznać znaczenie potencjalnego białka regulatorowego *Msmeg_0432* w metabolizmie związków azotowych u *M. smegmatis*, określono globalny profil ekspresji genów u szczepu dzikiego oraz mutantów Δ *msmeg_0432* i Δ *msmeg_5784*, w warunkach głodu azotowego oraz wysokiej zawartości azotu.

Szczep dziki oraz mutanty Δ *msmeg_0432* i Δ *msmeg_5784* hodowano w podłożu płynnym Sautona z jedynym źródłem azotu w postaci 1 mM lub 30 mM siarczanu amonu. Po dwóch godzinach od czasu całkowitego wykorzystania jonów amonowych w hodowlach

zawierających początkowo 1 mM siarczanu amonu, wszystkie hodowle wirowano a osady wykorzystywano do izolacji RNA. Uzyskane preparaty RNA służyły do przygotowania bibliotek, które następnie sekwencjonowano na platformie NextSeq 500 (Illumina). Poszczególne etapy prowadzące do uzyskania profili ekspresji genów badanych szczepów wraz z bioinformatyczną analizą opisano w rozdziale Metody 4.22. Wszystkie wyniki sekwencjonowania zestawiono w Pliku 5.2. na płycie CD załączonej do pracy. Część wyników przedstawiono w Tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Profil ekspresji wybranych genów szczepu Δ msmeg_0432 *M. smegmatis* hodowanego w warunkach głodu azotowego w porównaniu ze szczepem kontrolnym, z uwzględnieniem funkcji genów oraz miejsc występowania motywu palindromowego w obrębie sekwencji kodujących geny.

Gen	WT	Log2 FC	FDR	Pozycja sekwencji regulatorowej ctCAC(18N)GTGag box	Funkcja
MSMEG_0427	0	-5,10	2,24E-08	-109 do -81 i -93 do -65	nirB; reduktaza azotynu
MSMEG_0428	0	-4,55	3,11E-09		nirD; reduktaza azotynu
MSMEG_0433	0	-5,89	6,05E-09	-93 do -65	białko transportujące azotan/azotyn
MSMEG_1392	0	2,08	1,97E-02	brak	dehydrogenaza alkoholowa
MSMEG_1711	0	1,50	2,42E-02	brak	białko wiążące ATP
MSMEG_2079	0	1,90	6,20E-03	-74 do -46	dehydrogenaza alkoholowa
MSMEG_2184	0	1,56	3,58E-02	-220 do -192	permeaza aminokwasowa
MSMEG_3992	0	-1,50	4,38E-02		transporter membranowy
MSMEG_3993	0	-1,75	3,71E-02		racemaza asparagianu/glutaminianu; izomeraza maleinianowa
MSMEG_3994	0	-1,66	2,81E-02		krótki łańcuch dehydrogenazy
MSMEG_3996	0	-1,56	2,42E-02	-148 do -120 i -56 do -28	hydA; hydantoinaza
MSMEG_4008	0	-1,94	1,90E-02	-1196 do -1168 *	oksydoreduktaza
MSMEG_4010	0	-2,83	1,98E-02		gliokslaza
MSMEG_4011	0	-2,23	6,27E-03		permeaza pirymidynowa RutG
MSMEG_4012	0	-2,24	4,57E-03		hydA; hydantoinaza
MSMEG_4013	0	-1,99	3,78E-03		oksydoreduktaza
MSMEG_4014	0	-2,06	6,18E-04		amidohydrolaza
MSMEG_4206	0	-2,00	2,64E-02	-94 do -66	pseudogen / reduktaza azotanowa / reduktaza siarczynu
MSMEG_5360	0	-5,62	8,70E-05	-129 do -101	transporter mrowczanu/azotanu
MSMEG_5765	0	-5,85	6,94E-08	-94 do -66	hemoglobina bakteryjna

* sekwencja regulatorowa obecna w regionie międzygenowym genów MSMEG_4008 - MSMEG_4007

FDR (ang. false discovery rate) - częstość fałszywych odkryć

Log2FC (ang. fold change) - logarytm ilorazu poziomu ekspresji

WT - szczep dziki

Porównując profile ekspresji genów szczepu dzikiego i Δ msmeg_0432 w warunkach dostępności azotu, nie obserwowano znaczących różnic w poziomach transkryptów. W warunkach głodu azotowego w szczepie mutancie odnotowano natomiast obniżony poziom

siedmiu transkryptów odpowiadającym czterem pojedynczym ramkom odczytu oraz trzem operonom (Tabela 5.2.). W szczepie dzikim ekspresja tych samych transkryptów była specyficznie indukowana w warunkach głodu azotowego, podczas gdy w warunkach dostępności azotu pozostawała na niskim poziomie. Białka kodowane przez geny o obniżonej ekspresji w szczepie Δ msmeg_0432 są zaangażowane w szlaki metabolizmu azotanów, azotynów, pochodnych nukleotydów oraz magazynowanie azotu. Jeden z genów koduje bakteryjną hemoglobinę. Analiza MEME regionów promotorowych genów potencjalnie wchodzących w skład regulonu Msmeg_0432 ujawniła obecność częściowo zdegradowanego motywu palindromowego (c-t-C-A-C-a/c-(16N)-t/g-G-T-G-a-g) znajdującego się w sąsiedztwie motywu rozpoznawanego przez białko Msmeg_5784 (Rycina 5.12.).

A

```

>msmeg_0433
tctCACaggtgcccggcagatccagGTGagcggaaatttcaacggccgggtcatctggcGCAGTgtcgggGCAATAatcgctttcttagcgtgctcgcacg
      NnaR box                                putative GlnR box

>msmeg_0427 NirB
ccggagcactCACcggtcgggacctCACatGTGcgttgcgcgaagacGTGagacacocgtgatgggggcttcacacagcGCGACAtggcgGCAATAccgggttcttagcctgcctatg

>msmeg_4206
actCACcgcgcacccgtggcgcGTGanaaccagtttctctgacgctaacccccgcGAAAATctaccGAAAGcccgccgccaccatgggcacatg

>msmeg_5765
tctCACaacgcactcacaagacaGTGTGagcagcacgtagcggaccocggtacgcctggGCAATGtggcgGAAAGcgggttctccgacgctgaaacgcatg

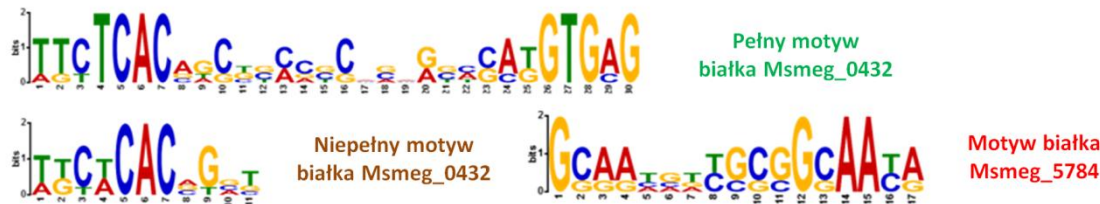
>msmeg_5360
AtctCACagccagcctgagcctgactGTGcgcagatggcaacacocgatgcataaggtcaactgctcgaaccGCAATctggcgGCGACccggtctagggaactgtccaatcggggtccatcggaaggttgcaacc
aatg

>msmeg_4008
gttcgggacctcggatccaccacgctcagaccggcgaccgctgtaaacccgagctttcggatGCACATccgtGTGATctgtgttacatcacagggttctcgatgtaaggcgtgacaggtcacccttga
tctggcgggtgatcgtctcttctgctggcaocgtgttctgctgcgcgaaacctgctgtatccgctatgagacagggagccaaacacgtg

>msmeg_3996
ttcGTAAGcgcgcACACagccaaaactgocgatgacaggggaggtactGTGACcttccgctgaacagcgcGTGacagatccggcgatactcgtcggaggtgacgcgggtgcccaatcgccggcgg
cgatcgcctcggcggcaccocgcgatgagatgtgctcgtgcacaacgtgtgtgacagaacgcgttgcaacocgtg

```

B



C

MtrA_msmeg	GEQISLTPLEFDLLVALARKPRQVFTRDVLLEQVWGYRHPADTRLVNVHVQRLRAKVEKDPENPQVVLIVRGVGYK	76
MtrA_mtu	GEQISLTPLEFDLLVALARKPRQVFTRDVLLEQVWGYRHPADTRLVNVHVQRLRAKVEKDPENPQVVLIVRGVGYK	76
Msmeg_5784	GKPLDLTYKEFELLKYLQAHAGRVFTRAQLLQEVWGYDFFGGTRIVDVHVRRLRAKLG--PEYEALIGIVRNVGYK	74
Rv0818	GRPLDLTYKEFELLKYLQAHAGRVFTRAQLLHEVWGYDFFGGTRIVDVHVRRLRAKLG--PEHEALIGIVRNVGYK	74
	. :. **:* **:: :**** **:* ***** . .** *:*:*:*:*: ** :: **:*.*	

Figura 5.12. Schemat regionów promotorowych genów przypuszczalnego regulonu Msmeg_0432 wskazujący potencjalne motywy DNA dla regulacji zależnej od białka Msmeg_0432 i Msmeg_5784, zidentyfikowany na podstawie wyników globalnej analizy transkryptomu. (A) Sekwencje zawierające przewidywane motywy regulatorowe genów kontrolowanych przez białko Msmeg_0432 w warunkach głodu azotowego. Analizie poddano sekwencje promotorowe wybranych genów lub pierwszego genu w operonie. Kolorem niebieskim zaznaczone są kodony startu natomiast pojedyncze czerwone litery oznaczają

przewidywane miejsca inicjacji transkrypcji. (B) Analiza MEME przeprowadzona dla transkryptów o poziomie ekspresji wyższym niż wartość $-1,5 \log_2FC$ (niepełny motyw białka Msmeg_0432) i wyższym niż wartość $\pm 2 \log_2FC$ (pełny motyw białka Msmeg_0432 oraz motyw białka Msmeg_5784 związany z regulacją przez białko Msmeg_0432) w mutancie $\Delta msmeg_0432$ *M. smegmatis* podczas głodu azotowego. (C) Porównanie sekwencji aminokwasowej domen wiążących DNA dla białek Msmeg_5784/Rv0818 i MtrA *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*.

Obniżenie ekspresji wyżej opisanych siedmiu transkryptów oraz innych genów zaangażowanych w metabolizm związków azotowych obserwowano w szczepie $\Delta msmeg_5784$ hodowanym w warunkach głodu azotowego. Zgodnie z danymi literaturowymi (Jenkins i wsp., 2013) u mutantu $\Delta msmeg_5784$ obserwowano zmiany ekspresji dużej liczby genów zarówno w warunkach głodu azotowego jak i przy wysokiej zawartości azotu. Ograniczenie dostępu azotu powodowało u mutantu zmiany w ekspresji 527 genów oraz 633 genów w warunkach bogatych w azot. Co więcej, inaktywacja genu *msmeg_5784* skutkowałą obniżeniem ekspresji genu *msmeg_0432* czyniąc mutantu $\Delta msmeg_5784$ naturalnym mutantem $\Delta msmeg_0432$. W obecności źródła azotu u mutantu $\Delta msmeg_5784$ obserwowano ekspresję genu *msmeg_0432* na poziomie $-2,33 \log_2FC$ (logarytm ilorazu ekspresji), podczas gdy w warunkach ubogich w azot poziom transkryptów dla tego genu wynosił $-9,37 \log_2FC$.

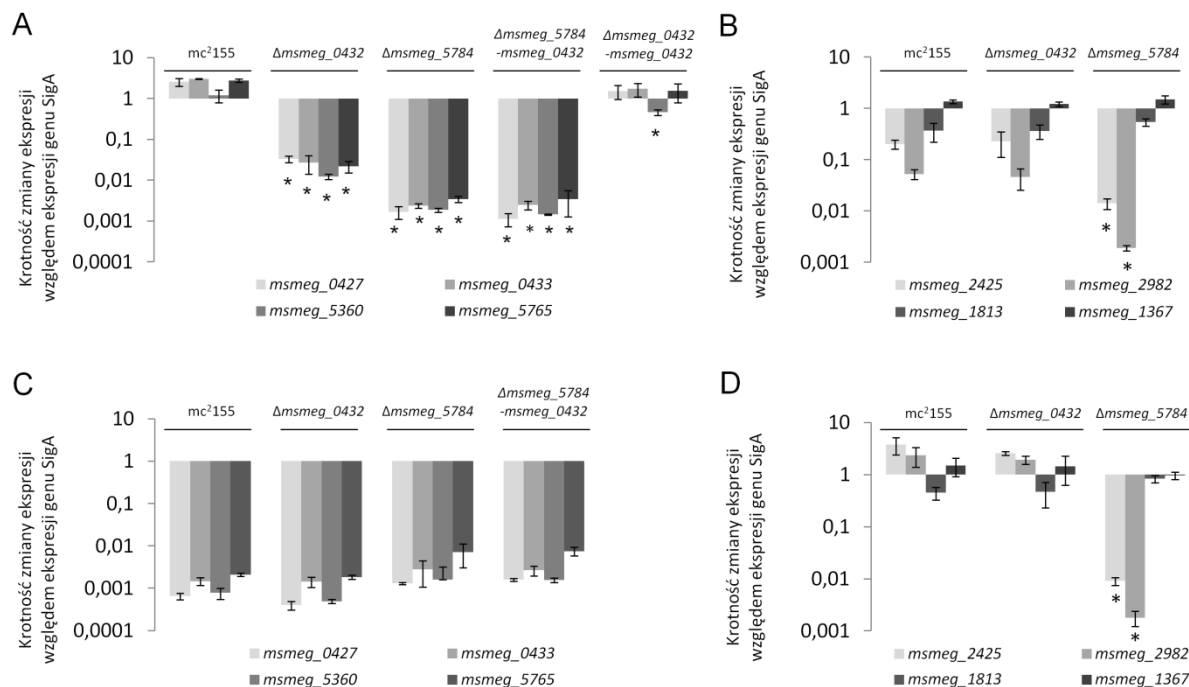
5.5.1. Weryfikacja wyników sekwencjonowania RNA metodą qRT-PCR

Walidacji wyników uzyskanych w globalnej analizie transkryptomu dokonano techniką qRT-PCR. W badaniu oceniano poziom ośmiu transkryptów umożliwiających charakterystykę badanych szczepów hodowanych w warunkach głodu azotowego oraz dostępności azotu. Do analizy wybrano cztery geny, których ekspresja była znacząco obniżona u szczepów mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* w warunkach głodu azotowego (*msmeg_0427* – NirB, reduktaza azotynu; *msmeg_0433* – transporter azotanu/azotynu; *msmeg_5360* – transporter mrówczanu/azotanu; *msmeg_5765* – hemoglobina bakteryjna), dwa geny, których ekspresja była znacząco niższa u mutantu $\Delta msmeg_5784$ w porównaniu do mutantu $\Delta msmeg_0432$, w odpowiedzi na brak azotu (*msmeg_2425* – transporter jonów amonowych; *msmeg_2982* – transporter mocznika) oraz dwa geny niezwiązane z metabolizmem związków azotowych (*msmeg_1813* – AccD5 karboksyltransferaza; *msmeg_1367* – podjednostka β polimerazy RNA).

Do analizy qRT-PCR wykorzystywano RNA szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ hodowanych w warunkach bogatych i ubogich w azot, na podstawie których określano profile ekspresji genów. Ponadto, przygotowano RNA szczepów komplementowanych $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ *M. smegmatis* poddawanych działaniu takich samych warunków (Metody 4.22.).

Preparaty RNA używano do syntezy cDNA, stanowiących matryce w analizie qRT-PCR. Oceny ekspresji genów dokonywano za pomocą komercyjnego zestawu Maxima SYBR green qPCR master mix (Thermo Scientific) z odpowiednimi oligonukleotydami (Tabela 3.2.), na urządzeniu 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems). Przygotowanie cDNA oraz dokładne warunki analizy opisano w rozdziale Metody 4.23. Doświadczenie wykonywano w trzech powtórzeniach, wykorzystując matryce cDNA uzyskane z preparatów RNA wyizolowanych z trzech niezależnych hodowli.

Poziomy badanych transkryptów wyznaczano w odniesieniu do poziomu ekspresji genu referencyjnego *sigA* (kodującego u mykobakterii czynnik σ^{70}) stosując tzw. metodę komparatywną ($\Delta\Delta C_t$) (Livak i Schmittgen, 2001). Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 5.13.



Rycina 5.13. Profile ekspresji wybranych genów w szczepie kontrolnym oraz mutantach $\Delta msmeg_0432$, $\Delta msmeg_5784$, $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ *M. smegmatis* hodowanych w warunkach głodu azotowego (A, B) oraz

dostępności azotu (C, D) określone metodą qRT-PCR. W badaniu oceniono ekspresję genów *msmeg_0427*, *msmeg_0433*, *msmeg_5360*, *msmeg_5765* (A, C) oraz *msmeg_2425*, *msmeg_2982*, *msmeg_1813* i *msmeg_1367* (B, D). Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,01$).

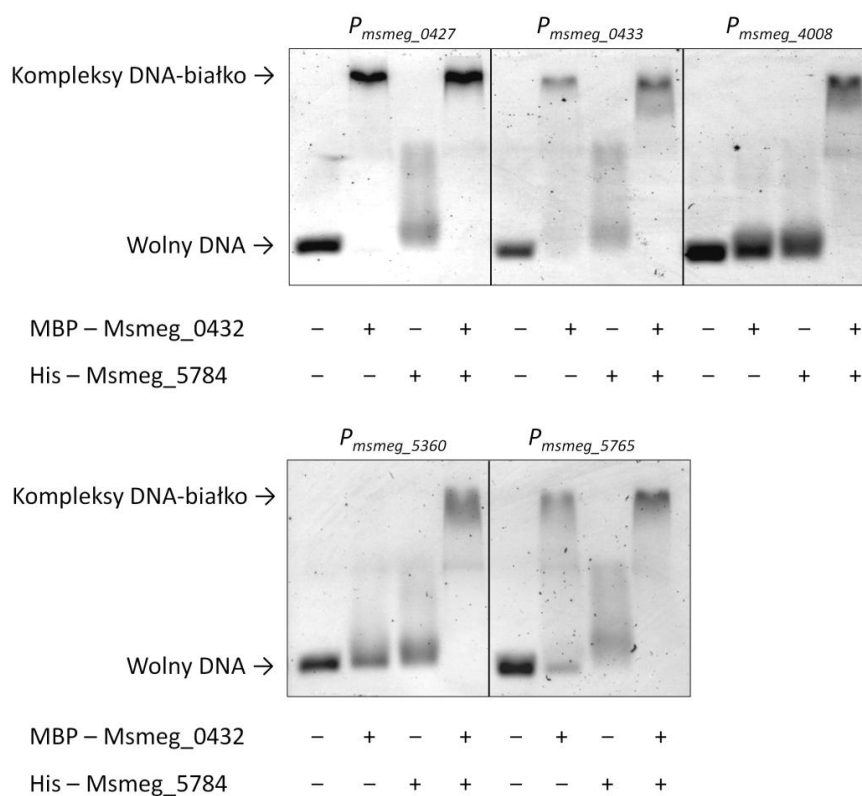
Przeprowadzone badania potwierdziły wyniki uzyskane w globalnej analizie transkryptomu. W preparatach RNA pochodzących ze szczepów Δ *msmeg_0432* i Δ *msmeg_5784* hodowanych w warunkach głodu azotowego obserwowano znacząco niższy poziom transkryptów *msmeg_0427*, *msmeg_0433*, *msmeg_5360* i *msmeg_5765*, w stosunku do szczepu dzikiego. Co więcej, poziom badanych transkryptów u Δ *msmeg_5784* komplementowanego funkcjonalnym genem *msmeg_0432* (Δ *msmeg_5784-attB::phspmsmeg_0432*) był zbliżony do tego, który uzyskano dla Δ *msmeg_5784*. Profil ekspresji genów Δ *msmeg_0432-attB::phspmsmeg_0432* był natomiast podobny (poza jednym genem) do profilu uzyskanego dla szczepu dzikiego (Rycina 5.13. A). W warunkach dostępności azotu nie obserwowano znaczących różnic w poziomie ekspresji genów *msmeg_0427*, *msmeg_0433*, *msmeg_5360* i *msmeg_5765* pomiędzy wszystkimi analizowanymi szczepami (Rycina 5.13. C).

Analiza qRT-PCR potwierdziła znacząco niższą ekspresję genów *msmeg_2425* i *msmeg_2982* u mutantu Δ *msmeg_5784*, w porównaniu do mutantu Δ *msmeg_0432* zarówno w warunkach ubogich, jak i obfitych w azot. Zgodnie z oczekiwaniami, w badanych warunkach nie obserwowano znaczących różnic w ekspresji genów *msmeg_1813* i *msmeg_1367* (Rycina 5.13. B, D).

5.6. Badanie oddziaływania białek Msmeg_0432 i Msmeg_5784 z DNA techniką EMSA

Sekwencjonowanie RNA szczepów mutantów Δ *msmeg_0432* i Δ *msmeg_5784* *M. smegmatis* hodowanych w warunkach głodu azotowego oraz analiza qRT-PCR wykazały, że w odpowiedzi na wykorzystanie dostępnego azotu białko Msmeg_0432 reguluje ekspresję kilku genów zaangażowanych w metabolizm związków azotowych (Wyniki 5.5.). Aby zweryfikować czy białko to bezpośrednio wiąże się do sekwencji regulatorowych zidentyfikowanych genów przeprowadzono analizę oddziaływania rekombinowanego białka MBP-Msmeg_0432 z promotorami wybranych genów. W badaniach wykorzystano także rekombinowane białko His-Msmeg_5784, bezpośredni regulator białka Msmeg_0432 i potencjalny współregulator.

Oddziaływania białek MBP-Msmeg_0432 i His-Msmeg_5784 z DNA badano metodą EMSA, szczegółowo opisaną w rozdziale Metody 4.35. Do analizy wybrano sekwencje promotorowe genów *msmeg_0427*, *msmeg_0433*, *msmeg_4008*, *msmeg_5360* oraz *msmeg_5765*, które do testu amplifikowano przy użyciu odpowiednich sekwencji starterowych (Tabela 3.3.). Znakowane heksachlorofluoresceiną krótkie fragmenty DNA w ilości 30 nM inkubowano z 2 μ M białka MBP-Msmeg_0432, 4 μ M białka His-Msmeg_5784 lub mieszaniną obu białek, w takich samych stężeniach, jakie używano do reakcji z pojedynczymi białkami. Rozdzielone elektroforetycznie kompleksy białek z DNA wizualizowano za pomocą fluorescencyjnego skanera Typhoon 8600 Imager Scanner (GE Healthcare). Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiono na Rycinie 5.14.

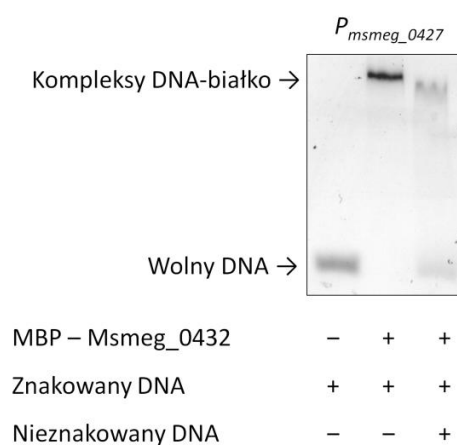


Rycina 5.14. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji białka MBP-Msmeg_0432 (2 μ M), His-Msmeg_5784 (4 μ M) oraz mieszaniny białek z sekwencjami promotorowymi genów *msmeg_0427*, *msmeg_0433*, *msmeg_4008*, *msmeg_5360* i *msmeg_5765* (30 nM).

Rekombinowane białko MBP-Msmeg_0432 w stężeniu 2 μ M wiązało się do promotorów genów *msmeg_0427*, *msmeg_0433* oraz *msmeg_5765*, natomiast nie rozpoznawało sekwencji regulatorowych genów *msmeg_4008* i *msmeg_5360*. Co ciekawe, wiązanie tych dwóch fragmentów DNA było możliwe, kiedy sondy inkubowano z mieszaniną

białek MBP-Msmeg_0432 oraz His-Msmeg_5784, co może świadczyć o ich współregulacji. W żadnej z reakcji z udziałem samego białka His-Msmeg_5784 w stężeniu 4 μ M nie obserwowano kompleksu białka z badanymi sekwencjami promotorowymi.

Aby sprawdzić czy wiązanie białka MBP-Msmeg_0432 z DNA jest specyficzne przeprowadzono test kompetycji z użyciem sekwencji regulatorowej genu *msmeg_0427*, z którą białko najsilniej oddziaływało. W tym celu, do standardowej reakcji białka ze znakowanym DNA dodawano nieznakowaną sekwencję promotora, w ilości 100-krotnie większej względem wyznakowanej sondy. Elektroforetyczną analizę uzyskanych w teście produktów przedstawiono na Rycinie 5.15.



Rycina 5.15. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji białka MBP-Msmeg_0432 (2 μ M) ze znakowaną (30 nM) i nieznakowaną (300 nM) sekwencją promotora genu *msmeg_0427*.

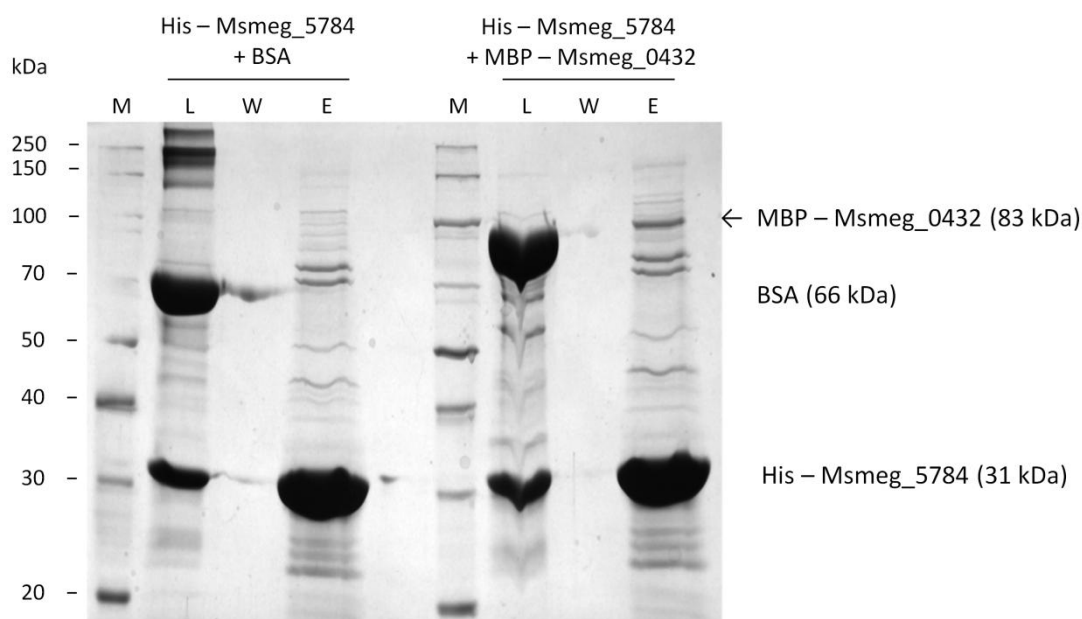
Inkubacja białka MBP-Msmeg_0432 ze znakowaną sondą skutkowała związaniem DNA i utworzeniem kompleksu, podczas gdy dodatek nieznakowanej sekwencji regulatorowej powodował osłabienie wiązania. Świadczyła o tym obecność niezwiązanego znakowanego DNA oraz znacząco słabszy kompleks DNA-białko w reakcji z kompetytorem. Obserwacje te potwierdziły specyficzność wiązania białka MBP-Msmeg_0432 z badanym promotorem.

5.7. Badanie oddziaływania białek Msmeg_0432 i Msmeg_5784 metodą Pull-down

Analizę oddziaływania badanych białek wykonano techniką opartą o chromatografię powinowactwa, w której jedno z białek jest immobilizowane do kulek magnetycznych, podczas gdy białko partnerskie nie wykazuje powinowactwa do złoża. Interakcję między białkami stwierdza się na podstawie obecności obu białek w eluatach po wielokrotnym

płukaniu złoza magnetycznego. Poszczególne etapy badania oddziaływań białek Msmeg_0432 i Msmeg_5784 opisano w rozdziale Metody 4.33.

W przeprowadzonym doświadczeniu cząsteczką immobilizowaną do kulek magnetycznych było rekombinowane białko His-Msmeg_5784. W układzie badanym złoże inkubowano z białkiem MBP-Msmeg_0432, natomiast w układzie kontrolnym z BSA. Frakcje z różnych etapów analizy rozdzielano elektroforetycznie w 12% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących (Metody 4.31.). Wyniki rozdzielania przedstawiono na Rycinie 5.16.

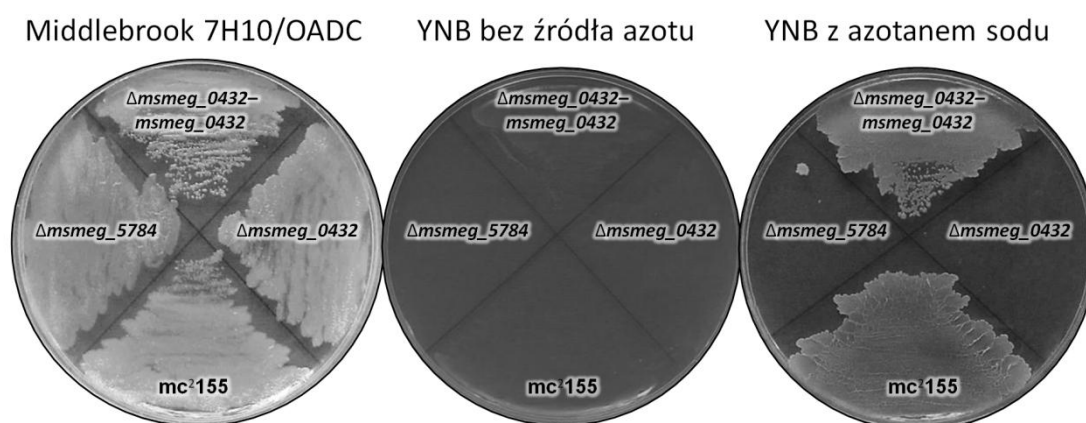


Rycina 5.16. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas badania oddziaływania białek MBP-Msmeg_0432 i His-Msmeg_5784 w 12% żelu poliakrylamidowym: (M) wzorzec mas cząsteczkowych, (L) frakcja białka immobilizowanego do złoza oraz białka partnerskiego, (W) frakcja pochodząca z płukania złoza, (E) frakcje po elucji ze złoza.

W układzie badanym, w uzyskanym eluacie obecne były niewielkie ilości białka MBP-Msmeg_0432 w stosunku do białka His-Msmeg_5784. Obserwacje te pozwalają wnioskować, że badane białka wykazują słabe oddziaływanie. W eluacie pochodzącym z układu kontrolnego nie obserwowano BSA, co świadczyło o braku interakcji tego białka z białkiem His-Msmeg_5784 oraz jego całkowitym odpłukaniem ze złoza.

5.8. Analiza wzrostu i przeżywalności mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* w obecności azotanu i azotynu sodu

Wyniki analizy mikromacierzy fenotypowych oraz sekwencjonowania transkryptomu wskazywały na udział białka Msmeg_0432 w metabolizmie azotanów i azotynów. Postanowiono zatem ocenić wzrost szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów $\Delta msmeg_0432$, $\Delta msmeg_5784$ i $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phspmsmeg_0432}$ *M. smegmatis* na podłożu stałym YNB zawierającym azotan sodu jako jedyne źródło azotu, o końcowym stężeniu 10 mM (Metody 4.24.). Kontrolę eksperymentu stanowiło podłoże YNB pozbawione źródła azotu oraz podłoże bogate Middlebrook 7H10/OADC. Wzrost szczepów na testowanych podłożach przedstawiono na Rycinie 5.17.

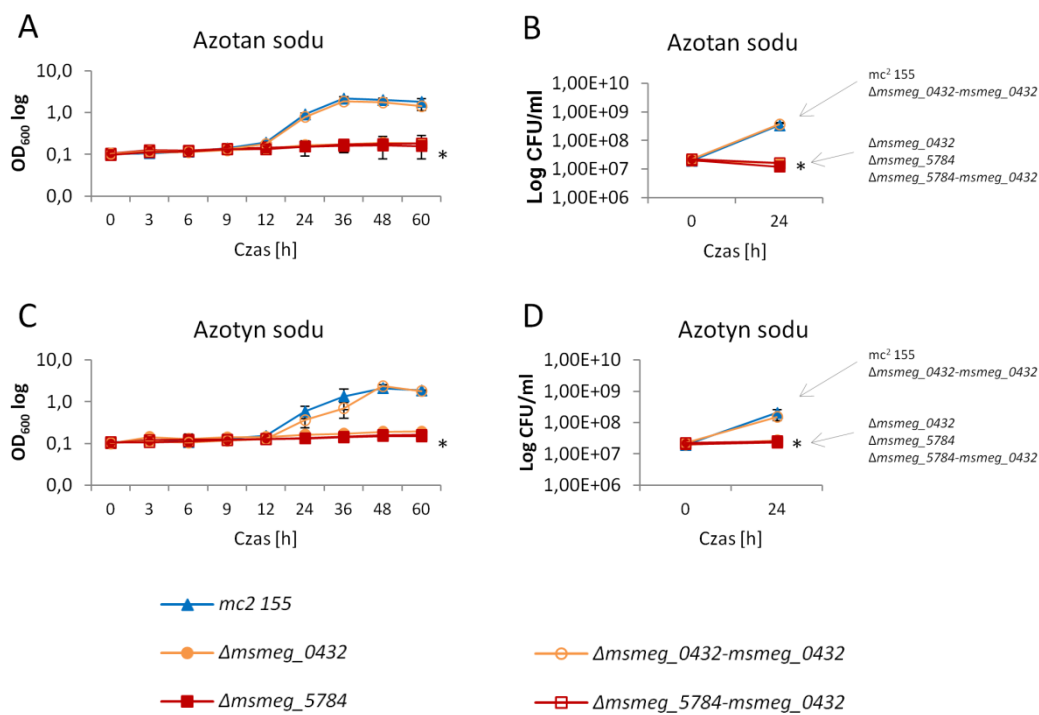


Rycina 5.17. Wzrost szczepu dzikiego, szczepów mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ oraz szczepu komplementowanego $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phspmsmeg_0432}$ *M. smegmatis* na podłożu bogatym Middlebrook 7H10/OADC, YNB pozbawionym źródła azotu oraz YNB z azotanem sodu (10 mM).

Szczepy mutanty $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ nie wykazywały wzrostu na podłożu YNB z azotanem sodu, natomiast szczep $\Delta msmeg_0432$ komplementowany funkcjonalnym genem *msmeg_0432* wykazywał wzrost w obecności badanego źródła azotu, podobnie jak szczep dziki. Na podłożu bogatym Middlebrook 7H10/OADC obserwowano wzrost każdego z analizowanych szczepów.

W kolejnych analizach oceniano wzrost i przeżywalność badanych szczepów w podłożu płynnym Sautona zawierającym azotan sodu (10 mM) oraz azotyn sodu (5 mM) jako jedyne źródło azotu. Do doświadczenia włączono także szczep $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\text{phspmsmeg_0432}$, który stanowił dodatkową kontrolę. Analizę w podłożu płynnym poprzedzała 16 godzinna indukcja głodu azotowego w podłożu płynnym Sautona

pozbawionym źródła azotu. Miała ona na celu wyczerpanie wewnątrzkomórkowej puli związków azotu. Kinetykę wzrostu w obecności azotanu i azotynu sodu określono poprzez pomiar gęstości optycznej OD_{600} , natomiast liczbę żywych komórek oceniono techniką CFU (Metody 4.25.). Uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 5.18.



Rycina 5.18. Kinetyka wzrostu oraz przeżywalność szczepu dzikiego, szczepów mutantów Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 oraz szczepów komplementowanych Δ msmeg_0432-*attB::phspmsmeg_0432* i Δ msmeg_5784-*attB::phspmsmeg_0432* *M. smegmatis* w podłożu Sautona zawierającym (A, B) azotan sodu (10 mM) i (C, D) azotyn sodu (5 mM) jako źródło azotu. Analizy wzrostu w wyznaczonych punktach czasowych dokonywano przez pomiar gęstości optycznej OD_{600} hodowli. Przeżywalność szczepów w 24 godzinie oceniano poprzez określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU). Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,01$).

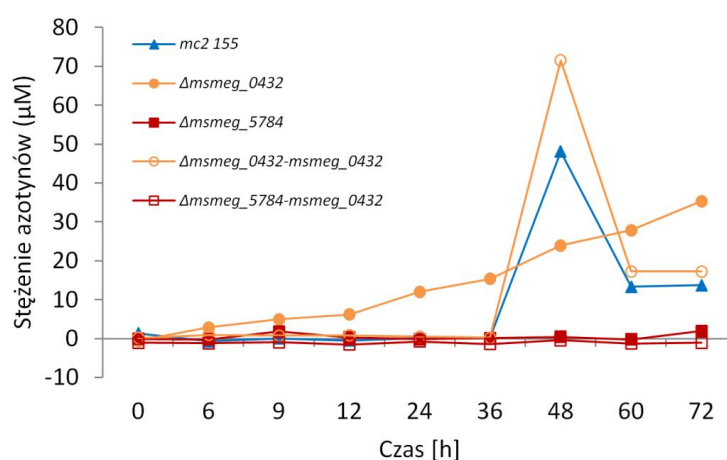
Analiza kinetyki wzrostu wykazała, że szczepy Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 charakteryzują się znacząco spowolnionym tempem wzrostu w obecności azotanu i azotynu sodu, w porównaniu do szczepu dzikiego. Biorąc pod uwagę wyniki globalnej analizy transkryptomu można wnioskować, że mutanty te utraciły zdolność do asymilacji badanych związków. Komplementacja mutantu Δ msmeg_0432 funkcjonalnym genem *msmeg_0432* spowodowała przywrócenie fenotypu szczepu dzikiego. Co ciekawe, wzrost mutantu Δ msmeg_5784 (charakteryzującego się obniżoną ekspresją genu *msmeg_0432*) komplementowanego genem *msmeg_0432* był podobny do wzrostu mutantu Δ msmeg_5784.

Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że obecność w komórce białka Msmeg_0432 nie kompensuje braku funkcjonalnego regulatora Msmeg_5784 i że obecność obu badanych białek regulatorowych jest niezbędna dla ekspresji genów, których produkty odpowiadają za asymilację azotanów i azotynów.

Wyniki przeżywalności badanych szczepów były zgodne z kinetyką wzrostu. Po 24 godzinach hodowli w obecności azotanu i azotynu sodu przeżywalność szczepu Δ msmeg_0432 była niższa o 95% (azotan) i 87% (azotyn) w stosunku do szczepu dzikiego. Podobnie w przypadku mutantu Δ msmeg_5784, liczba żywych komórek była obniżona o 96,5% (azotan) i 88,5% (azotyn).

5.9. Ocena zdolności szczepów Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 *M. smegmatis* do konwersji azotanów do azotynów oraz azotynów do amoniaku

Aby ocenić, czy znaczące obniżenie przeżywalności mutantów Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 *M. smegmatis* w obecności azotanu sodu było spowodowane utraceniem zdolności szczepów do konwersji azotanów do azotynów, w supernatantach pochodzących z hodowli w podłożu Sautona zawierającym azotan sodu (10 mM) określano stężenia azotynów. Próbkę do oznaczeń pobierano w określonych punktach czasowych z hodowli, w których analizowano kinetykę wzrostu oraz przeżywalność szczepów (Wyniki 5.8.). Przygotowanie supernatantów oraz ilościową ocenę azotynów przy użyciu komercyjnego zestawu Griess Reagent System (Promega) opisano w rozdziale Metody 4.26. Do badania włączono szczep dziki oraz mutanty Δ msmeg_0432, Δ msmeg_5784, Δ msmeg_0432-attB::*phspmsmeg_0432* i Δ msmeg_5784-attB::*phspmsmeg_0432*. Uzyskane wyniki zobrazowano na Rycinie 5.19.



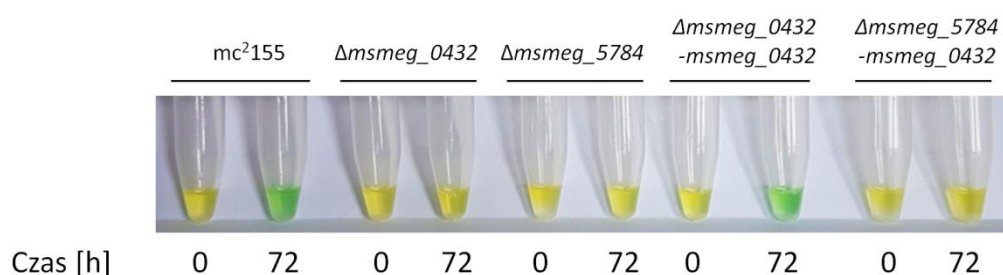
Rycina 5.19. Stężenia azotynów w supernatantach pochodzących z hodowli szczepu dzikiego, szczepów mutantów Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 oraz szczepów komplementowanych

$\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\textit{phspmsmeg_0432}$ i $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\textit{phspmsmeg_0432}$ *M. smegmatis* w podłożu Sautona zawierającym azotan sodu (10 mM) jako źródło azotu. Oznaczenia stężeń azotynów dokonano na 96-dołkowych płytkach przy użyciu komercyjnego zestawu Griess Reagent System (Promega). Przedstawiono jeden reprezentatywny z trzech wykonanych eksperymentów.

Analiza stężeń azotynów w hodowlach w podłożu Sautona z azotanem sodu wykazała, że szczep $\Delta msmeg_0432$ jest zdolny do redukcji azotanów, jednak nie asymiluje produktu tej konwersji. W przeciwieństwie do szczepu dzikiego, nie obserwowano wzrostu mutantu w obecności badanego źródła azotu, pomimo tego, że odnotowano wzrastające stężenie azotynów. Komplementacja mutantu $\Delta msmeg_0432$ funkcjonalnym genem *msmeg_0432* spowodowała przywrócenie zdolności asymilacji azotynów. Mutant $\Delta msmeg_5784$ nie przekształcał azotanów, ponadto komplementacja tego mutantu genem *msmeg_0432* nie powodowała przywrócenia zdolności konwersji.

Na podstawie wyników analizy można wnioskować, że u mutantu $\Delta msmeg_0432$ szlaki zaangażowane w asymilację azotanów i azotynów są częściowo aktywne. Uzyskany profil ekspresji genów mutantu w warunkach głodu azotowego oraz badania opublikowane dla *Streptomyces* (Amin i wsp., 2012) wskazują, że za przeżywalność bakterii w obecności azotanów i azotynów jako jedynych źródeł azotu mogą odpowiadać produkty genów *nirB* i *nirD*, których ekspresja u mutantu $\Delta msmeg_0432$ jest znacząco obniżona. Obserwacje dotyczące mutantu $\Delta msmeg_5784$ komplementowanego genem *msmeg_0432* sugerują, że ekspresja enzymów zaangażowanych w konwersję azotanów jest możliwa kiedy oba regulatory są w komórce aktywne.

W celu sprawdzenia czy azotyny ulegają dalszym przekształceniom, we wszystkich supernatantach, w których oznaczano stężenia azotynów oceniono obecność jonów amonowych, produktów konwersji azotynów. Do tego celu wykorzystano komercyjny zestaw Ammonium Test (Merck) pozwalający na analizę metodą kolorymetryczną (Metody 4.26.). Wyniki badania dla supernatantów z 0 i 72 godziny hodowli przedstawiono na Rycinie 5.20.



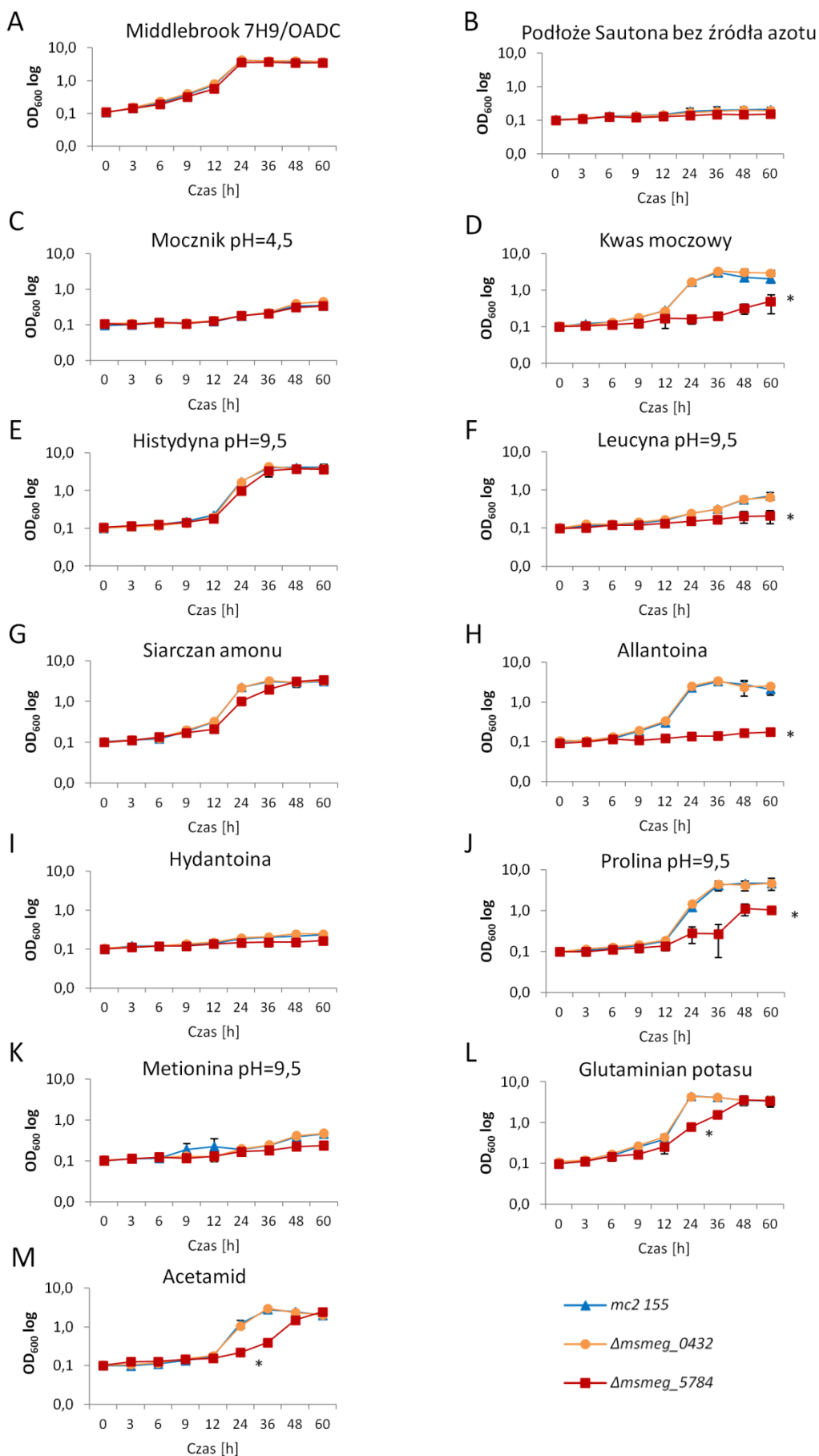
Rycina 5.20. Ocena obecności jonów amonowych w supernatantach pochodzących z hodowli szczepu dzikiego, mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ oraz szczepów komplementowanych $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$ *M. smegmatis* w podłożu Sautona zawierającym azotan sodu (10 mM) jako źródło azotu. Analizę wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu Ammonium Test (Merck) w mikroskali. Kolor zielony jest efektem powstania pochodnej indofenolu i wskazuje na obecności jonów amonowych w podłożu hodowlanym. Na zdjęciu przedstawiono reprezentatywne próby badane.

Przeprowadzona analiza wykazała obecność jonów amonowych w supernatantach pochodzących z 72 godziny hodowli szczepu dzikiego i szczepu komplementowanego $\Delta msmeg_0432\text{-attB}::\text{phsp}msmeg_0432$. W próbkach z pozostałych punktów czasowych, dla wszystkich badanych szczepów nie odnotowano zawartości jonów amonowych w podłożu. Obserwacje te wydają się potwierdzać, że mutant $\Delta msmeg_0432$ utracił zdolność asymilacji azotanów i azotynów na skutek znacząco obniżonej ekspresji genów *nirB* i *nirD*, zaangażowanych w przemiany azotynów do amoniaku.

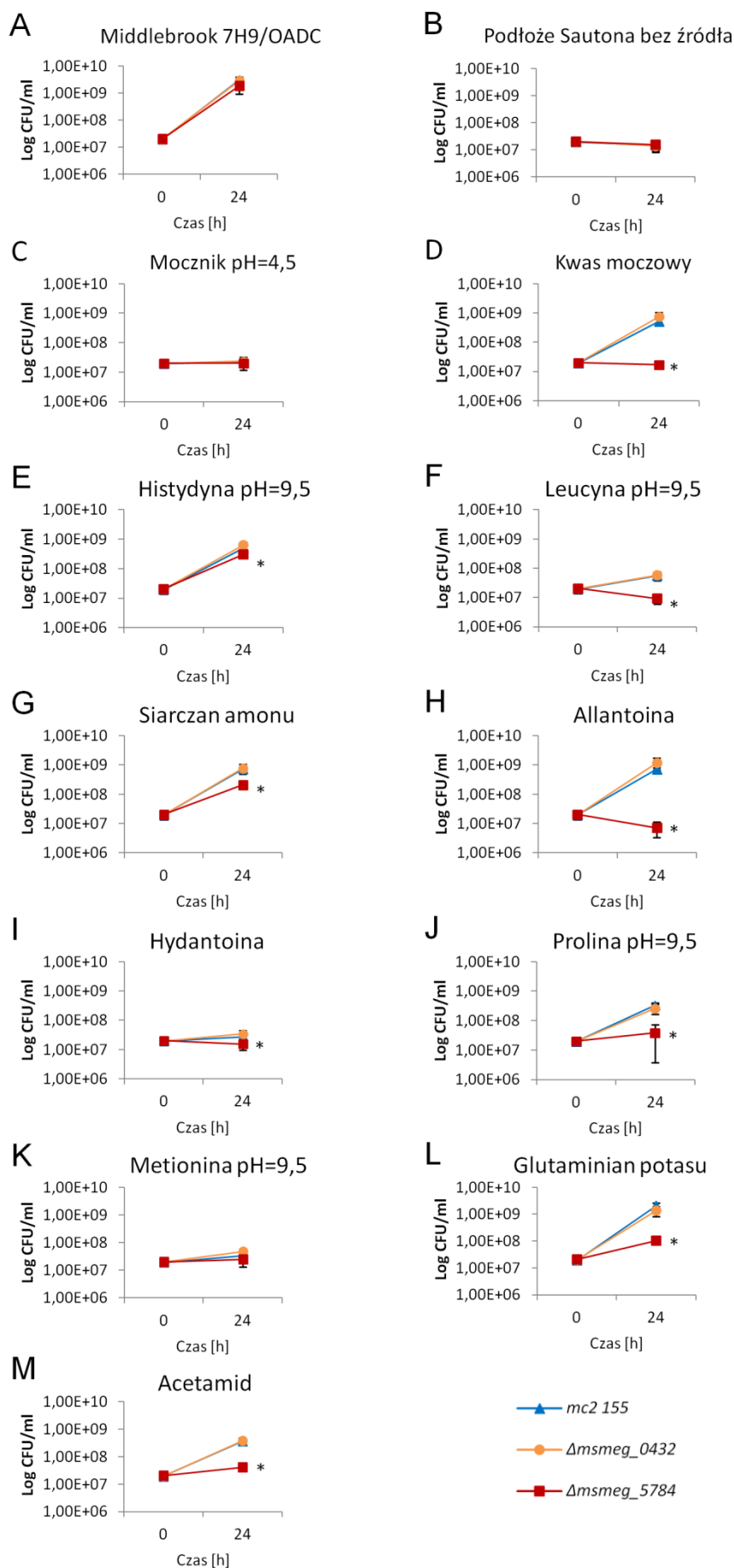
5.10. Analiza wzrostu i przeżywalności mutantów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* w podłożu Sautona z różnymi źródłami azotu

Biorąc pod uwagę wyniki sekwencjonowania transkryptomu oraz cechy fenotypowe szczepów $\Delta msmeg_0432$ i $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis* w obecności azotanów i azotynów postanowiono ocenić zdolność badanych szczepów do asymilacji różnych źródeł azotu. Badanie poprzedzała indukcja głodu azotowego prowadzona w podłożu płynnym Sautona bez obecności źródła azotu. Analizę wykonywano poprzez pomiar gęstości optycznej OD₆₀₀ oraz określenie liczby żywych komórek techniką CFU, w hodowlach w podłożu płynnym Sautona zawierającym różne źródła azotu (Metody 4.25.).

Większość testowanych źródeł azotu takich jak mocznik (pH=4,5), kwas moczowy, histydyna (pH=9,5), leucyna (pH=9,5), prolina (pH=9,5), metionina (pH=9,5), acetamid, allantoina i glutaminian potasu zostało wybrane spośród związków wskazanych w analizach wykorzystaniem macierzy fenotypowych. Dodatkowo sprawdzono aktywność metaboliczną szczepów w obecności hydantoiny i siarczanu amonu. Każde źródło testowano w stężeniu 10 mM, za wyjątkiem acetamidu, którego stężenie końcowe w hodowli wynosiło 5 mM. Wzrost i przeżywalność badanych szczepów w obecności badanych związków przedstawiono na Rycinach 5.21. i 5.22.



Rycina 5.21. Kinetyka wzrostu szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów $\Delta msmeg_{0432}$ i $\Delta msmeg_{5784}$ *M. smegmatis* na (A) podłożu Middlebrook 7H9/OADC, (B) w podłożu Sautona pozbawionym źródła azotu oraz w podłożu Sautona zawierającym następujące źródła azotu: (C) mocznik, (D) kwas moczowy, (E) histydyna (pH=9,5), (F) leucyna (pH=9,5), (G) siarczan amonu, (H) allantoina, (I) hydantoina, (J) prolina (pH=9,5), (K) metionina (pH=9,5), (L) glutaminian potasu i (M) acetamid. Końcowe stężenie związków w hodowli wynosiło 10 mM, za wyjątkiem acetamidu (5 mM). Analizy wzrostu dokonywano przez pomiar gęstości optycznej OD_{600} hodowli w wyznaczonych punktach czasowych. Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,01$).



Rycina 5.22. Analiza przeżywalności szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów Δ msmeg_0432 i Δ msmeg_5784 *M. smegmatis* na (A) podłożu Middlebrook 7H9/OADC, (B) w podłożu Sautona pozbawionym źródła azotu oraz w podłożu Sautona zawierającym następujące źródła azotu: (C) mocznik, (D) kwas moczowy, (E) histydyna (pH=9,5), (F) leucyna (pH=9,5), (G) siarczan amonu, (H) allantoina, (I) hydantoina, (J) prolina (pH=9,5), (K) metionina (pH=9,5), (L) glutaminian potasu i (M) acetamid. Końcowe stężenie związków w hodowli wynosiło 10 mM, za wyjątkiem acetamidu (5 mM). Przeżywalność szczepów w 24 godzinie oceniano poprzez określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU). Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu t-Studenta (* $p < 0,01$).

Analiza przeżywalności nie wykazała znaczących różnic pomiędzy szczepem dzikim a szczepem Δ msmeg_0432. W przypadku szczepu mutantu Δ msmeg_5784 obserwowano znaczące obniżenie przeżywalności w obecności kwasu moczowego (96,6%), histydyny (40,2%), leucyny (83,5%), glutaminianu potasu (95,1%) i acetamidu (88,5%), w stosunku do szczepu dzikiego. Najgorzej asymilowanym źródłem azotu przez wszystkie badane szczepy był mocznik, metionina (pH=9,5) i hydantoina. Dla większości badanych związków, wyniki uzyskane dla szczepu Δ msmeg_0432 były zgodne z analizą fenotypową BIOLOG za wyjątkiem mocznika (pH=4,5), allantoiny i proliny (pH=9,5). Wartości gęstości optycznej OD₆₀₀ odpowiadały poziomom przeżywalności szczepów w badanych warunkach.

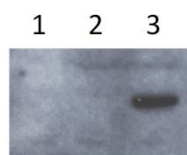
5.11. Wstępna charakterystyka fenotypowa szczepu Δ rv0260c *M. tuberculosis*

5.11.1. Ocena poziomu białka Rv0260c w szczepie dzikim oraz szczepach mutantach Δ rv0260c i Δ rv0260c-attB::*phsp*rv0260c *M. tuberculosis*

Białko Rv0260c obecne w komórkach *M. tuberculosis* jest homologiem białka Msmeg_0432 występującego u *M. smegmatis*. Funkcja białka Rv0260c w fizjologii prątków gruźlicy jest nieznana, jednak wiadomo, że ekspresja genu *rv0260c* jest indukowana w warunkach głodu azotowego (Williams i wsp., 2015).

W celu określenia poziomu białka Rv0260c w komórkach mykobakterii przeprowadzono analizę western blot (Metody 4.32.), z wykorzystaniem lizatów komórkowych (Metody 4.34.) szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów Δ rv0260c i Δ rv0260c-attB::*phsp*rv0260c *M. tuberculosis*, hodowanych w podłożu płynnym Middlebrook 7H9/OADC, w temperaturze 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀=0,8 – 1. W badaniu zastosowano mysie poliklonalne przeciwciała skierowane

przeciwno białku SUMO-Rv0260c, które analizowano na wcześniejszych etapach pracy. Wyniki doświadczenia przedstawiono na Rycinie 5.23.

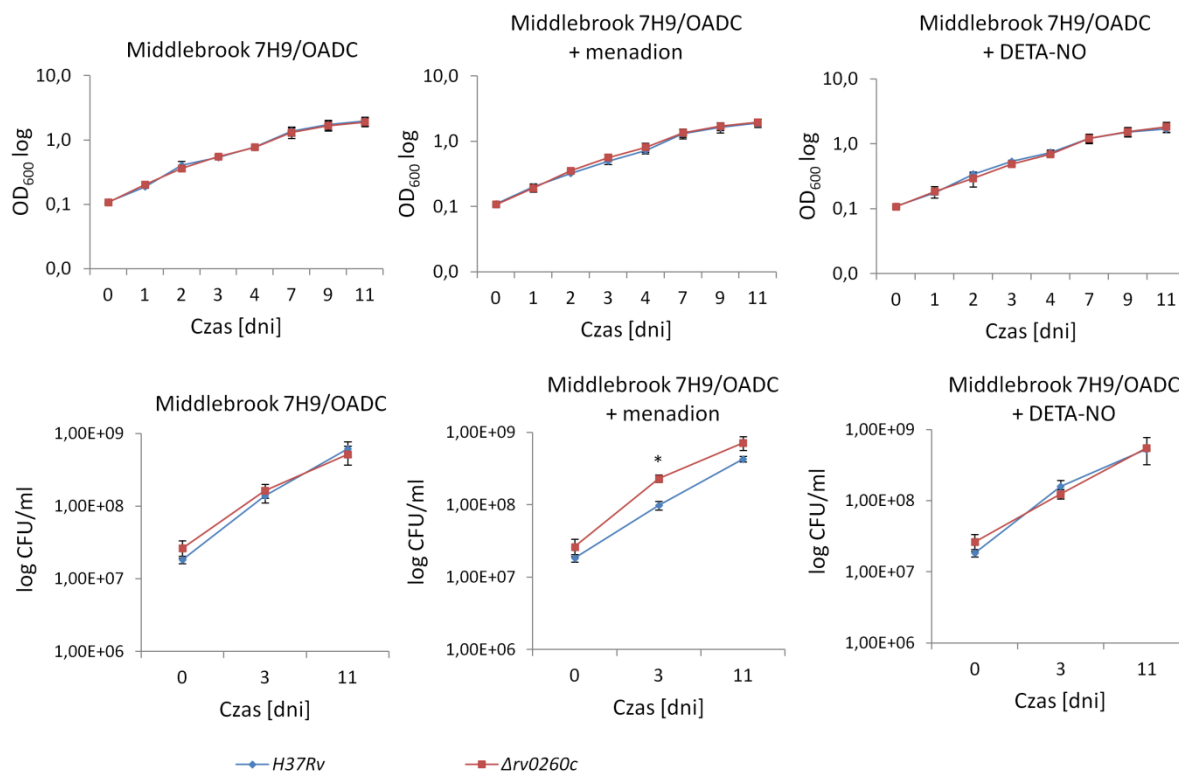


Rycina 5.23. Analiza western blot lizatów komórkowych (1) szczepu dzikiego oraz szczepów mutantów (2) $\Delta rv0260c$ i (3) $\Delta rv0260c-attB::phsp rv0260c$ *M. tuberculosis* z użyciem mysich poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko białku SUMO-Rv0260c w proporcji 1:2000.

Analiza poziomu białka Rv0260c w komórkach mykobakterii techniką western blot, nie umożliwiła detekcji białka w ekstrakcie białkowym pochodzącym ze szczepu dzikiego *M. tuberculosis*. Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że w badanych warunkach naturalny poziom białka w komórce jest bardzo niski, a do indukcji białka może dochodzić w specyficznych warunkach. Badanie potwierdziło natomiast wysoki poziom badanego białka w mutancie $\Delta rv0260c$ komplementowanym funkcjonalnym genem *rv0260c*, ulegającym ekspresji pod kontrolą silnego promotora *P_{hsp60}*. W lizacie komórkowym mutantu $\Delta rv0260c$ nie obserwowano obecności białka Rv0260c.

5.11.2. Analiza kinetyki wzrostu i przeżywalności szczepu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* w obecności reaktywnych form tlenu i azotu

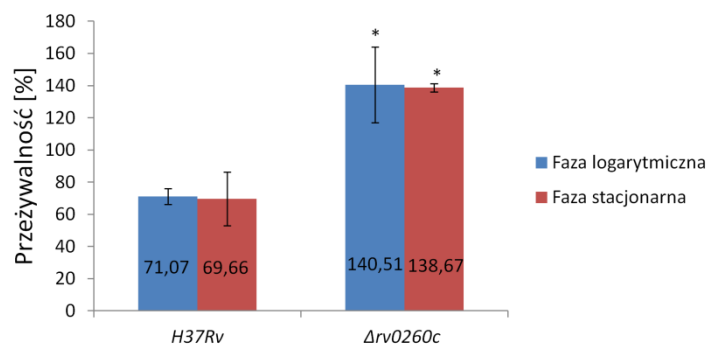
Ogólną charakterystykę szczepu mutantu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* (odpowiednik mutantu $\Delta msmeg_0432$ *M. smegmatis*) rozpoczęto od analizy wzrostu i przeżywalności w podłożu bogatym Middlebrook 7H9/OADC z dodatkiem menadionu (10 μ M) i DETA-NO (25 μ M), związków generujących wolne rodniki (Metody 4.37.). W prowadzonych hodowlach induktorem stresu oksydacyjnego był menadion, podczas gdy źródłem reaktywnych form azotu był DETA-NO. Działanie wolnych rodników zaburzających procesy komórkowe oceniano przez pomiar gęstości optycznej OD₆₀₀ oraz określenie liczby żywych komórek w 1 ml badanych prób (CFU). Wyniki analizy przedstawiono na Rycinie 5.24.



Rycina 5.24. Kinetyka wzrostu (górny panel) i przeżywalności (dolny panel) szczepu dzikiego oraz szczepu mutanta $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* w podłożu Middlebrook 7H9/OADC, w obecności związków generujących reaktywne formy tlenu i azotu: menadionu (10 μM) i DETA-NO (25 μM). Analizy wzrostu dokonywano przez pomiar gęstości optycznej OD₆₀₀ w wyznaczonych punktach czasowych natomiast przeżywalność szczepów oceniano poprzez określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU) w 3 i 11 dni hodowli. Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,01$).

Tempo wzrostu mutanta $\Delta rv0260c$ w podłożu bogatym Middlebrook 7H9/OADC oraz w obecności menadionu i DETA-NO nie różniło się od wzrostu szczepu dzikiego w badanych warunkach. Analiza przeżywalności była zgodna z kinetyką wzrostu badanych szczepów w podłożu bez dodatku związków oraz z DETA-NO, jednakże w obecności menadionu, w logarytmicznej fazie wzrostu obserwowano znacząco wyższą przeżywalność szczepu $\Delta rv0260c$, w stosunku do szczepu dzikiego.

W kolejnym etapie analizy postanowiono porównać przeżywalność badanych szczepów w obecności menadionu z przeżywalnością w podłożu bez dodatku związku przyjmując, że żywotność szczepów w hodowlach bez menadionu stanowi 100%. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 5.25.



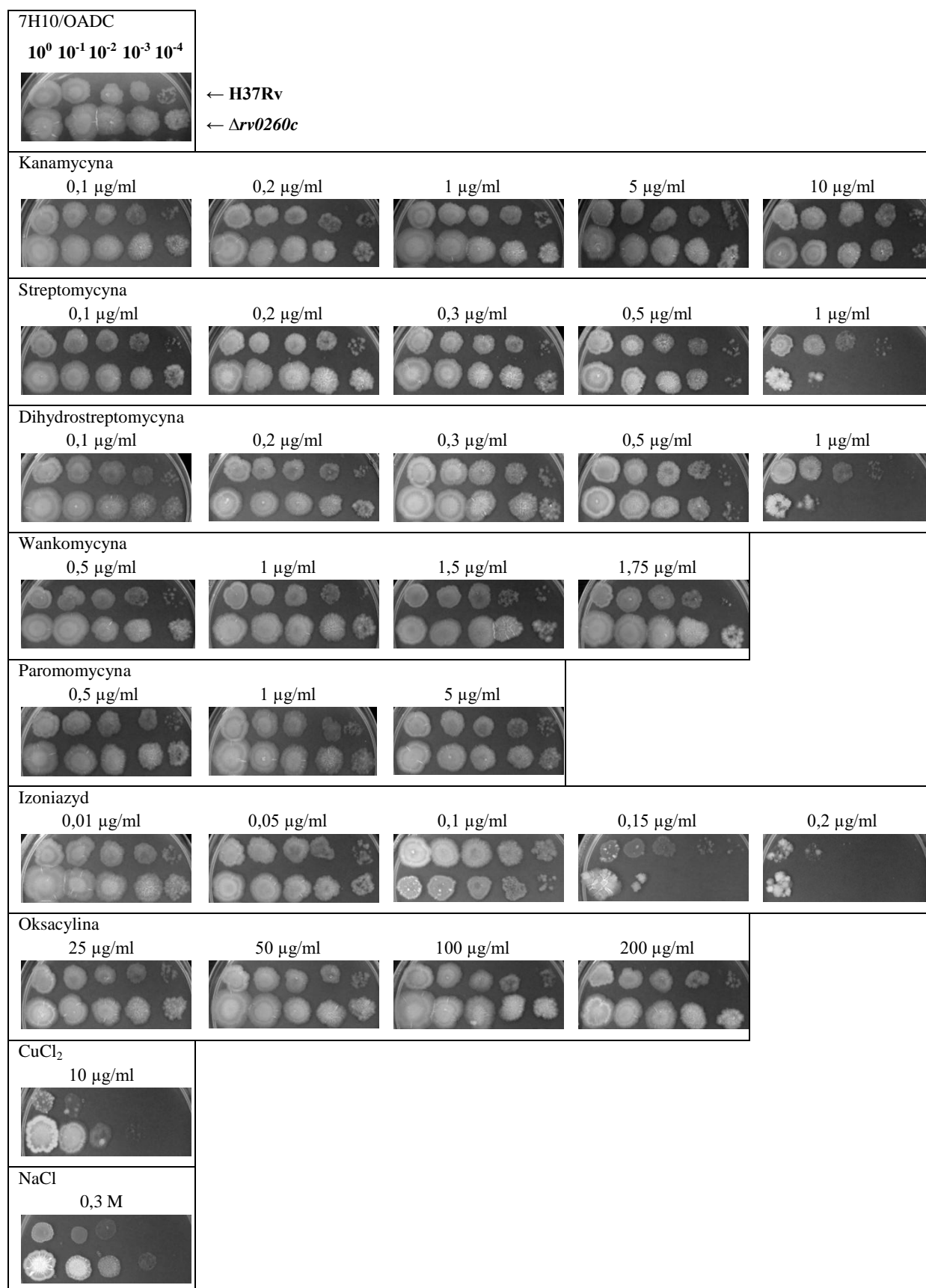
Rycina 5.25. Przeżywalność szczepu dzikiego i szczepu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* w obecności menadionu, w odniesieniu do przeżywalności tych szczepów w podłożu bez dodatku związku. Procentową przeżywalność wyznaczono na podstawie wyników uzyskanych metodą CFU. Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,05$).

Przeprowadzona analiza wykazała, że przeżywalność komórek szczepu dzikiego hodowanego z dodatkiem menadionu jest obniżona o 28,9% (w logarytmicznej fazie wzrostu) i 30,3% (w fazie stacjonarnej), względem przeżywalności tego szczepu w podłożu bez związku. Co ciekawe, w obecności wolnych rodników mutant $\Delta rv0260c$ charakteryzował się wyższą o 40,5% (w fazie logarytmicznej) i 38,7% (w fazie stacjonarnej) żywotnością w stosunku do tej, którą obserwowano w podłożu niezawierającym induktora stresu oksydacyjnego.

5.11.3. Porównanie wrażliwości szczepu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* oraz szczepu kontrolnego na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki

5.11.3.1. Ocena wrażliwości szczepu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na podłożu stałym testem kropkowym

Wrażliwość szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na wybrane antybiotyki oraz inne czynniki badano między innymi na podłożu stałym, poprzez naniesienie odpowiednio przygotowanych hodowli na płytki z podłożem Middlebrook 7H10/OADC zawierającym testowane związki w różnych stężeniach (Metody 4.38.). Analizy dokonywano porównując wzrost mutantu do wzrostu szczepu dzikiego w badanych warunkach. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 5.26.



Rycina 5.26. Wzrost szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC (kontrola) oraz Middlebrook 7H10/OADC zawierającym

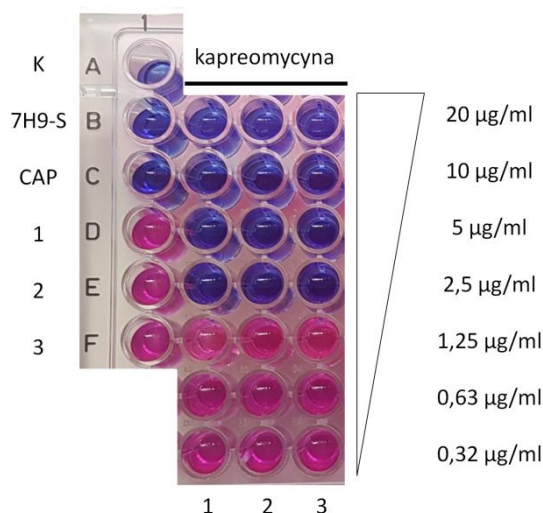
badane związki w wybranych stężeniach. Przy pierwszym panelu zaznaczono rozcieńczenia nanoszonych hodowli (dotyczy wszystkich płytek). Górna część płytek przedstawia wzrost szczepu dzikiego natomiast dolna część wzrost mutantu $\Delta rv0260c$.

Przeprowadzona analiza wykazała, że mutant $\Delta rv0260c$ charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na streptomycynę i dihydrostreptomycynę obecną w podłożu stałym w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Podobne obserwacje dotyczą izoniazydu zastosowanego w stężeniu 0,15 $\mu\text{g/ml}$ i 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Zmniejszoną wrażliwość mutantu w stosunku do szczepu dzikiego obserwowano natomiast na płytkach z chlorkiem miedzi (II) oraz chlorkiem sodu występujących w podłożu w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ i 0,3 M. W przypadku kanamycyny, paromomycyny i oksacyliny nie odnotowano różnic we wzroście badanych szczepów.

5.11.3.2. Ocena wrażliwości szczepu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* w podłożu płynnym metodą Microplate Alamar Blue Assay (MABA)

Analiza wrażliwości techniką MABA pozwala na fenotypową charakterystykę szczepów w podłożu płynnym z dodatkiem badanych czynników. O aktywności metabolicznej żywych komórek świadczy różowy kolor mikrohodowli po dodaniu rezazuryny o granatowym zabarwieniu. Metoda ta pozwala wyznaczyć minimalne stężenie związku hamujące wzrost drobnoustrojów (MIC), przy którym w hodowlach nie obserwuje się zmiany koloru odczynnika. Niestety, ze względu na niespecyficzne reakcje niektórych substancji bądź ich rozpuszczalników z rezazuryną, nie jest możliwe sprawdzenie aktywności metabolicznej szczepów w każdych warunkach.

Do badania metodą MABA wybrano część związków testowanych na podłożu stałym, ale także inne chemioterapeutyki. Prócz szczepu dzikiego i szczepu mutantu $\Delta rv0260c$ do analizy włączono także szczep komplementowany $\Delta rv0260c\text{-attB}::\text{phsp}rv0260c$ *M. tuberculosis*. Wykonanie eksperymentu opisano w rozdziale Metody 4.39. natomiast przykładowe zdjęcie płytki przedstawiające wynik testu przedstawiono na Rycinie 5.27. Wartości MIC badanych związków uzyskane dla poszczególnych szczepów zebrano w Tabeli 5.3.



Rycina 5.27. Ocena wrażliwości: (1) szczepu dzikiego oraz mutantów (2) $\Delta rv0260c$ i (3) $\Delta rv0260c-attB::phsp rv0260c$ *M. tuberculosis* w obecności różnych stężeń kapreomycyny; K – kontrola rezazuryny; 7H9-S – kontrola podłoża; CAP – kontrola antybiotyku.

Tabela 5.3. Wartości MIC testowanych związków wyznaczone dla szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta rv0260c$ i $\Delta rv0260c-attB::phsp rv0260c$ *M. tuberculosis* metodą MABA w trzech niezależnych eksperymentach.

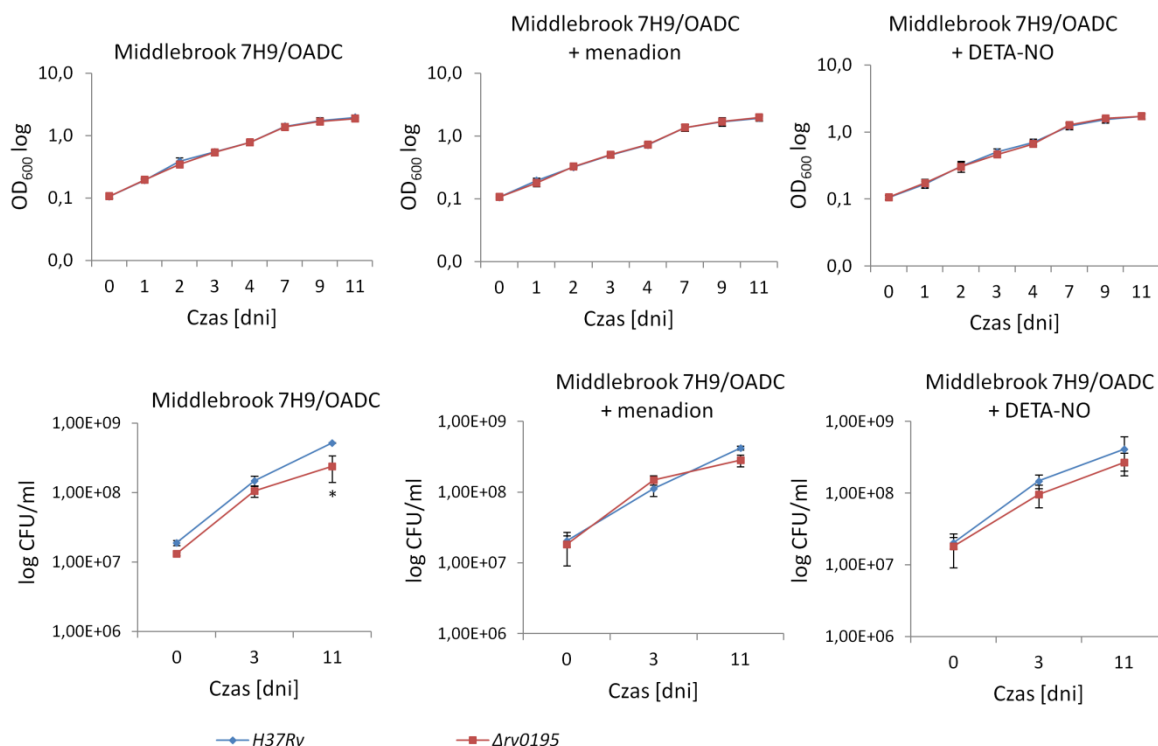
Związek	Wartość MIC H37Rv	Wartość MIC $\Delta rv0260c$	Wartość MIC $\Delta rv0260c-attB::phsp rv0260c$
8-hydroksychinolina	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Chlorek miedzi (II)	12,5 µg/ml	12,5 µg/ml	12,5 µg/ml
Dihydrostreptomycyna	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Etambutol	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Izoniazyd	0,06 µg/ml	0,06 µg/ml	0,06 µg/ml
Kanamycyna	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml
Kapreomycyna	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml	2,5 µg/ml
Ofloksacyna	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Rifampicyna	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml
Streptomycyna	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

Z przeprowadzonej analizy wynika, że mutant $\Delta rv0260c$ hodowany w obecności 8-hydroksychinoliny, etambutolu, kanamycyny, kapreomycyny, ofloksacyny i rifampicyny charakteryzuje się podobnym wzrostem jak szczep dziki. Badanie metodą MABA nie potwierdziło także różnic we wrażliwości badanych szczepów na izoniazyd, streptomycynę, dihydrostreptomycynę oraz chlorek miedzi (II), które obserwowano w testach na podłożu stałym. Odmiennosc uzyskanych wyników w obu testach może być konsekwencją różnej dostępności badanych związków oraz składników odżywczych dla drobnoustrojów na podłożu stałym i płynnym. Należy również pamiętać, że test MABA oparty jest o różnice w aktywności bójczej badanych związków, natomiast na podłożach stałych uwidaczniają się również różnice w aktywności bakteriostatycznej.

5.12. Wstępna charakterystyka fenotypowa szczepu $\Delta rv0195 M. tuberculosis$

5.12.1. Analiza kinetyki wzrostu i przeżywalności szczepu $\Delta rv0195 M. tuberculosis$ w obecności reaktywnych form tlenu i azotu

Dotychczasowe badania wskazują na udział białka Rv0195 w adaptacji do warunków beztlenowych oraz zjadliwości prątków gruźlicy (Fang i wsp., 2013). Skonstruowanego na potrzeby niniejszej pracy mutantu $\Delta rv0195 M. tuberculosis$ (brak odpowiednika u *M. smegmatis*) charakteryzowano w taki sam sposób jak mutantu $\Delta rv0260c$. Badania rozpoczęto od oceny kinetyki wzrostu i przeżywalności szczepu w podłożu bogatym Middlebrook 7H9/OADC w obecności menadionu (10 μM) i DETA-NO (25 μM) (Metody 4.37.). Wzrost komórek określano przez pomiar gęstości optycznej OD_{600} natomiast liczbę żywych komórek w 1 ml badanych prób wyznaczano techniką CFU. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rycinie 5.28.



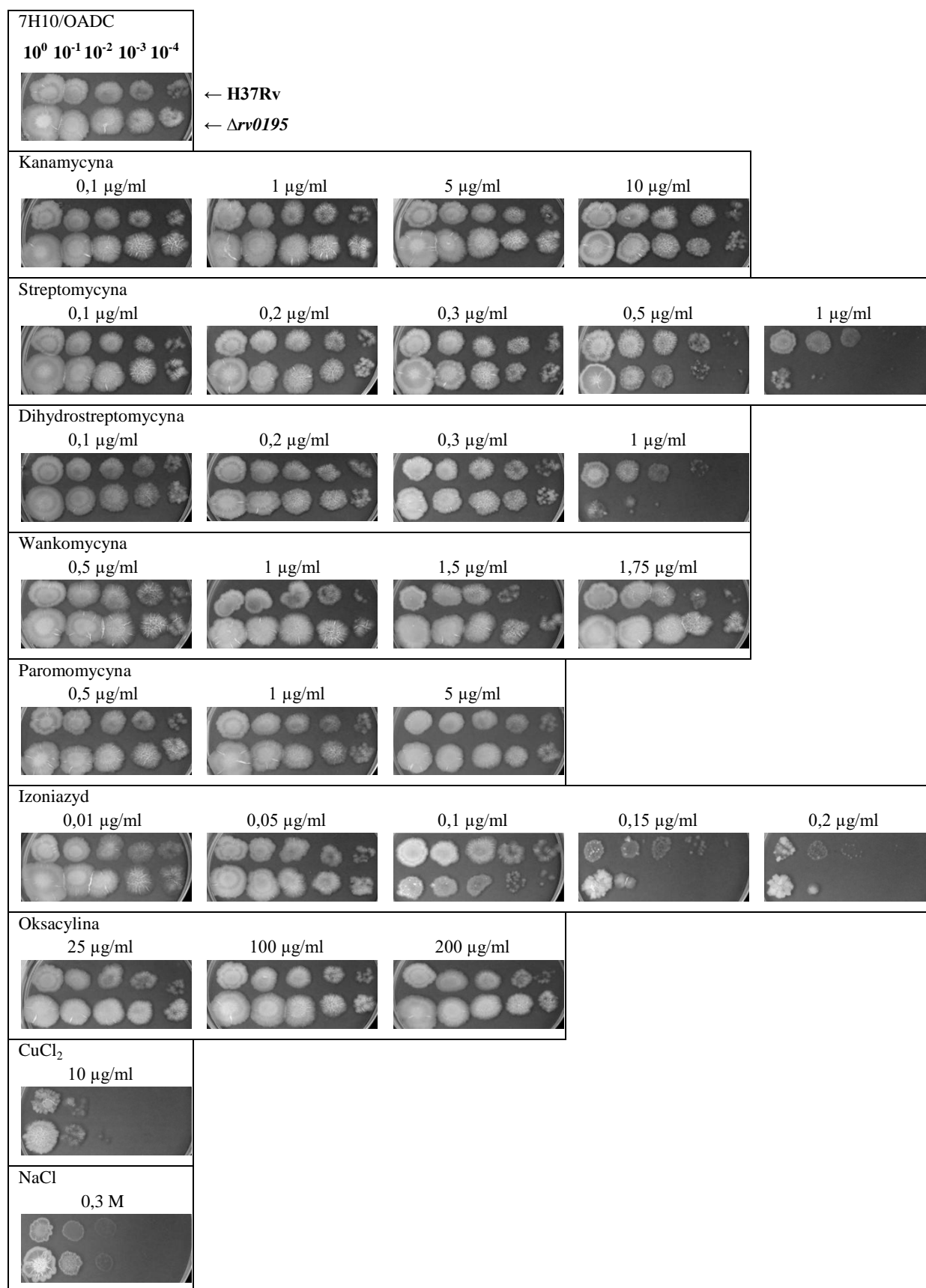
Rycina 5.28. Kinetyka wzrostu (górny panel) i przeżywalności (dolny panel) szczepu dzikiego oraz szczepu mutantu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* w podłożu Middlebrook 7H9/OADC, w obecności związków generujących reaktywne formy tlenu i azotu: menadionu (10 μ M) i DETA-NO (25 μ M). Analizy wzrostu dokonywano przez pomiar gęstości optycznej OD₆₀₀ w wyznaczonych punktach czasowych natomiast przeżywalność szczepów oceniano poprzez określenie liczby jednostek koloniotwórczych (CFU) w 3 i 11 dniu hodowli. Istotność statystyczną określono stosując test t-Studenta (* $p < 0,01$).

Przeprowadzona analiza nie wykazała różnic we wzroście szczepu dzikiego i mutantu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* zarówno w podłożu bogatym Middlebrook 7H9/OADC, jak i w obecności reaktywnych form tlenu i azotu. Przeżywalność szczepów w hodowlach z menadionem i DETA-NO była zgodna z kinetyką wzrostu. Różnice odnotowano natomiast w podłożu bogatym bez dodatku związków. W stacjonarnej fazie wzrostu mutant $\Delta rv0195$ charakteryzował się znacząco niższą przeżywalnością w stosunku do szczepu dzikiego. Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że białko Rv0195 bierze udział w adaptacji prątków do warunków tej fazy wzrostu.

5.12.2. Porównanie wrażliwości szczepu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* oraz szczepu kontrolnego na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki

5.12.2.1. Ocena wrażliwości szczepu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* na podłożu stałym testem kropkowym

Aby określić wrażliwość szczepu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* na wybrane czynniki hamujące wzrost drobnoustrojów, przeprowadzono analizę metodą kropkową, na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC zawierającym testowane związki (Metody 4.38.). Wyniki doświadczenia przedstawiono na Rycinie 5.29.



Rycina 5.29. Wzrost szczepu dzikiego oraz mutantu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* na podłożu stałym Middlebrook 7H10/OADC (kontrola) oraz Middlebrook 7H10/OADC zawierającym

badane związki w wybranych stężeniach. Przy pierwszym panelu zaznaczono rozcieńczenia nanoszonych hodowli (dotyczy wszystkich płytek). Górna część płytek przedstawia wzrost szczepu dzikiego natomiast dolna część wzrost mutantu $\Delta rv0195$.

Analiza wrażliwości wykazała, że na podłożu stałym mutant $\Delta rv0195$ cechuje się zwiększoną wrażliwością na niektóre antybiotyki aminoglikozydowe: streptomycynę oraz dihydrostreptomycynę, zastosowane w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$. Taki sam efekt odnotowano w obecności izoniazydu o końcowym stężeniu w podłożu 0,15 $\mu\text{g/ml}$ i 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Różnic między szczepami nie obserwowano natomiast na podłożu zawierającym kanamycynę, wankomycynę, paromomycynę, oksacylinę, chlorek miedzi (II) oraz chlorek sodu.

5.12.2.2. Ocena wrażliwości szczepu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* w podłożu płynnym metodą MABA

Wrażliwość mutantu $\Delta rv0195$ na wybrane związki w hodowlach płynnych w podłożu Middlebrook 7H9/OADC oceniono metodą MABA (Metody 4.39.). Do badań włączono szczep $\Delta rv0195$ komplementowany funkcjonalnym genem *rv0195* pod kontrolą własnej, potencjalnej sekwencji promotorowej. Określone dla badanych szczepów wartości MIC testowanych inhibitorów przedstawiono w Tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Wartości MIC testowanych związków wyznaczone dla szczepu dzikiego oraz mutantów $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0195\text{-attB}::_{prv0195}rv0195$ *M. tuberculosis* metodą MABA w trzech niezależnych eksperymentach.

Związek	Wartość MIC H37Rv	Wartość MIC $\Delta rv0195$	Wartość MIC $\Delta rv0195\text{-attB}::_{prv0195}rv0195$
8-hydroksychinolina	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Chlorek miedzi (II)	12,5 $\mu\text{g/ml}$	12,5 $\mu\text{g/ml}$	12,5 $\mu\text{g/ml}$
Dihydrostreptomycyna	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Etambutol	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Izoniazyd	0,06 $\mu\text{g/ml}$	0,06 $\mu\text{g/ml}$	0,06 $\mu\text{g/ml}$
Kanamycyna	2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$
Kapreomycyna	2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$
Ofloksacyna	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$

Rifampicyna	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml	0,001 µg/ml
Streptomycyna	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

Analiza wrażliwości metodą MABA nie wykazała różnic we wzroście badanych szczepów w obecności wszystkich testowanych substancji: 8-hydroksychinoliny, chlorku miedzi (II), dihydrostreptomycyny, etambutolu, izoniazydu, kanamycyny, kapreomycyny, ofloksacyny, rifampicyny i streptomycyny. W przypadku dihydrostreptomycyny, streptomycyny oraz izoniazydu, podobnie jak dla mutantu $\Delta rv0260$, nie potwierdzono zwiększonej wrażliwości szczepu $\Delta rv0195$, którą obserwowano badając wzrost na podłożach stałych.

6. Dyskusja

Sukces *M. tuberculosis* jako patogenu jest związany ze zdolnością bakterii do adaptacji do zmieniających się warunków środowiska napotykanym na różnych etapach infekcji. Za szybką reakcję na czynniki zewnętrzne, ale także za utrzymanie niektórych procesów życiowych komórki u mykobakterii odpowiadają dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału. Tworzą je kinazy histydynowe zakotwiczone w błonie komórkowej, które aktywowane bodźcem oddziałują z wewnątrzkomórkowymi czynnikami transkrypcyjnymi, regulującymi transkrypcję genów w odpowiedzi na sygnał (Stock i wsp., 2000). Wśród scharakteryzowanych u *M. tuberculosis* dwukomponentowych systemów znajdują się białka regulatorowe o mało poznanej roli, dla których partnerskie kinazy oraz sygnały aktywujące nie zostały do tej pory zidentyfikowane. Są to między innymi białka poddane analizie w niniejszej pracy doktorskiej: Rv0195 i Rv0260c. Głównym celem badań było określenie funkcji wybranych „sierocych” regulatorów u mykobakterii. W części badań wykorzystano model szybko rosnących prątków *M. smegmatis*, w genomie których obecne jest białko Msmeg_0432 będące homologiem białka Rv0260c.

Badanie funkcji białek regulatorowych postanowiono wykonać poprzez konstrukcję rekombinowanych szczepów pozbawionych zdolności do ich syntezy oraz ich porównaniem ze szczepami typu dzikiego. Konstrukcję ukierunkowanych mutantów oparto o proces homologicznej rekombinacji uzyskując szczepy $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* oraz $\Delta msmeg_0432$ *M. smegmatis*, pozbawione funkcjonalnych, badanych genów. Uzyskanie tego typu mutantów wykazało, że w warunkach hodowli laboratoryjnej, nie są one niezbędne dla wzrostu mykobakterii.

W trakcie realizacji pracy doktorskiej ukazał się artykuł wskazujący na rolę białka Rv0195 w przeżywaniu bakterii w warunkach beztlenowych. W pracy tej zidentyfikowano ponad 180 genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny Rv0195 w odpowiedzi na zużycie tlenu oraz potwierdzono osłabienie zjadliwości szczepu pozbawionego funkcjonalnego białka, zarówno w komórkach THP-1 jak i u myszy C57BL/6 (Fang i wsp., 2013). Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe, w celu głębszej analizy mutantu $\Delta rv0195$ postanowiono ocenić wzrost i przeżywalność szczepu w obecności menadionu i DETA-NO, związków generujących reaktywne formy tlenu i azotu, napotykanym przez prątki w środowisku wewnątrzkomórkowym. Przeprowadzone analizy nie wykazały różnic w kinetyce wzrostu oraz żywotności między mutantem $\Delta rv0195$ a szczepem dzikim hodowanym w tych samych warunkach. Warto jednak podkreślić, że badane warunki nie

odzwierciedlają złożonej odpowiedzi makrofagów na infekcję. Zaobserwowano natomiast, że w stacjonarnej fazie wzrostu, w podłożu bogatym bez dodatku menadionu i DETA-NO mutant charakteryzował się znacząco niższą przeżywalnością w stosunku do szczepu dzikiego. Uwagę zwrócił także spowolniony wzrost koloni mutantu $\Delta rv0195$ na podłożu stałym. Fang i wsp. (2013) nie obserwowali osłabienia przeżywalności mutantu w warunkach tlenowych, jednakże podobnie jak my, odnotowali pojawianie się koloni mutantu z tygodniowym opóźnieniem. Uzyskany fenotyp może świadczyć o roli regulatora Rv0195 nie tylko w warunkach hipoksji, ale także w obecności tlenu. Nasze obserwacje wskazują na udział badanego białka w adaptacji do warunków fazy stacjonarnej, w której dochodzi do spowolnienia metabolizmu, wyczerpywania składników odżywczych i gromadzenia się produktów przemiany materii do poziomu szkodliwego dla bakterii.

W kolejnych etapach pracy sprawdzono wrażliwość mutantu $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* na wybrane tuberkulostatyki oraz inne czynniki hamujące wzrost drobnoustrojów wykorzystując do tego celu dwie metody, test kropkowy i MABA. Pierwsza z technik pozwala na analizę szczepów na podłożu stałym zawierającym testowane związki, z kolei druga umożliwia ocenę ich wzrostu w hodowli płynnej. Badania metodą kropkową wykazały większą w stosunku do szczepu dzikiego wrażliwość mutantu $\Delta rv0195$ na izoniazyd, streptomycynę oraz dihydrostreptomycynę, jednak uzyskanych wyników nie potwierdzono stosując test MABA. Obserwowana rozbieżność może wynikać z różnej dostępności związków odżywczych i badanych na obu rodzajach podłoża, ale także z charakteru zastosowanych metod. Analizy na podłożu stałym pozwalają na ocenę bakteriostatycznego i bakteriobójczego działania substancji, natomiast w podłożu płynnym w teście MABA obserwowana jest jedynie bakteriobójcza aktywność związku. Za uzyskany fenotyp mutantu $\Delta rv0195$ na podłożu stałym z antybiotykami aminoglikozydowymi może odpowiadać zaburzona regulacja genu *rpsI* (*rv3442c*) będącego elementem regulonu białka Rv0195, który scharakteryzowano metodą ChIP-Seq w globalnych analizach (http://tuberculosis.bu.edu/tbdb_sysbio/Resources.html). U *E. coli* gen ten koduje białko S9 wchodzące w skład podjednostki 30S rybosomu i prawdopodobnie odpowiada za utrzymanie prawidłowej ramki odczytu podczas translacji (Aseev i wsp., 2016). Antybiotyki aminoglikozydowe takie jak streptomycyna, czy jej pochodna dihydrostreptomycyna hamują w komórce syntezę białek poprzez wiązanie podjednostki 30S rybosomu, zakłócając mechanizmy kontroli translacji, w efekcie czego dochodzi do jej przedwczesnego zakończenia lub błędnych odczytów informacji genetycznej (Mingeot-Leclercq i wsp., 1999). Dodatkowe zakłócenie tego procesu w postaci niedoboru białka S9, może zatem nasilać

działanie antybiotyku. W regulonie białka Rv0195 znajdują się także geny, których produkty mogą mieć znaczenie w zwiększonej wrażliwości szczepu na izoniazyd, leku hamującego syntezę kwasów mykolowych, wchodzących w skład ściany komórkowej prątków (Unissa i wsp., 2016). Przykładem jest gen *rv2724c* kodujący hipotetyczną dehydrogenazę acylo-CoA zaangażowaną w degradację lipidów oraz gen *rv0191*, który prawdopodobnie koduje białko zaangażowane w transport leków przez błonę komórkową. Jednak ze względu na brak bezpośrednich dowodów, mechanizmy molekularne odpowiadające za zmiany wrażliwości mutantu $\Delta rv0195$ na niektóre tuberkulostatyki wciąż pozostają niewyjaśnione.

Analogiczne badania przeprowadzono dla mutantu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis*. Analiza wrażliwości szczepu na podłożu stałym wykazała, że charakteryzuje się on zwiększoną wrażliwością na te same antybiotyki co mutant $\Delta rv0195$. Obserwacje te mogą świadczyć o podobnej funkcji badanych regulatorów u *M. tuberculosis*. Warto zaznaczyć, że oba białka stanowią czynniki transkrypcyjne zaangażowane w odpowiedź komórki na czynniki środowiskowe. Co prawda, dane literaturowe wskazują na udział regulatora Rv0195 w wirulencji oraz przeżywalności prątków w warunkach beztlenowych, natomiast białko Rv0260c jest zaangażowane w metabolizm związków azotowych (Fang i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015). Nie wykluczone jest jednak, że oba czynniki regulują także procesy związane z antybiotykoopornością. Może ona wynikać z zaburzonych poziomów transkryptów dla białek o specyficznych funkcjach bądź innych, zaangażowanych w utrzymanie prawidłowej struktury komórki.

Ze względu na doniesienia literaturowe dotyczące zaawansowanej charakterystyki białka Rv0195, postanowiono nie kontynuować badań z udziałem mutantu $\Delta rv0195$ i w dalszych analizach skupiono się na określeniu funkcji regulatora Rv0260c w metabolizmie związków azotowych.

Zważywszy na fakt, że zarówno u *M. tuberculosis* jak i *M. smegmatis* ekspresja genu *rv0260c/msmeg_432* jest indukowana w warunkach ograniczonego dostępu azotu przez globalny regulator metabolizmu azotu jakim jest białko Rv0818/Msmeg_5784, poza szczepem dzikim oraz mutantem $\Delta msmeg_0432$ w doświadczeniach wykorzystano obecny w laboratorium szczep $\Delta msmeg_5784$ *M. smegmatis*, w charakterze dodatkowej kontroli (Jenkins i wsp., 2013; Williams i wsp., 2015). Badania rozpoczęto od analizy fenotypowej z użyciem macierzy w systemie BIOLOG oraz określenia globalnego profilu transkrypcyjnego (RNA-Seq) badanych szczepów hodowanych w warunkach głodu azotowego, które wykazały udział białka Msmeg_0432 w szlakach asymilacji azotanów i azotynów. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły zidentyfikować grupę genów, których

ekspresja podlega regulacji przez białko Msmeg_0432 w odpowiedzi na zużycie azotu. Zgodnie z opublikowanymi analizami *in silico* dotyczącymi homologicznego białka u *S. coelicolor*, białko Msmeg_0432 wpływa na ekspresję genów *nirB* (*msmeg_0427*) i *nirD* (*msmeg_0428*) kodujących kompleks reduktazy azotynów, genu *narK* (*msmeg_0433*) kodującego transporter dla azotanu/azotynu oraz pseudogenu *nasA* (*msmeg_4206*) (Amin i wsp., 2012). Ponadto zidentyfikowano geny *msmeg_5360* i *msmeg_5765* kodujące transporter mrówczanu/azotynu oraz hemoglobinę bakteryjną. Zaburzenie poziomu regulatora Msmeg_0432 w komórce, w mniejszym stopniu wpłynęło również na geny kodujące czynniki biorące udział w transporcie i recyklingu nukleotydów oraz asymilacji hydantoiny. W związku z tymi obserwacjami oceniono wzrost i przeżywalność szczepu Δ *msmeg_0432* *M. smegmatis* w obecności hydantoiny i allantoiny jako jedynych źródeł azotu, jednakże szczep laboratoryjny *M. smegmatis* nie był zdolny do wydajnej asymilacji hydantoiny. W analizach fenotypowych sprawdzono także zdolność badanych szczepów do przyswajania azotu z azotanu, azotynu i szeregu innych związków. Szczep Δ *msmeg_0432* był całkowicie niezdolny do wzrostu w podłożu zawierającym azotan lub azotyn jako źródło azotu, czyniąc gen *msmeg_0432* warunkowo niezbędnym do przeżycia komórki. Efektem obserwowanego fenotypu jest prawdopodobnie niezdolność szczepu mutantu do konwersji azotynu do amoniaku, przy niewystarczającej ekspresji genów *nirB* i *nirD* (reduktazy azotynów) obserwowanej na poziomie RNA. Badania potwierdziły, że mutant Δ *msmeg_0432* podobnie jak szczep dziki, przekształca azotany do azotynów, jednak nie jest zdolny do asymilacji produktu tej konwersji. Wysoce prawdopodobne jest także zaangażowanie białka Msmeg_0432 w metabolizm nukleotydów. Analiza fenotypowa systemem BIOLOG wykazała obniżoną aktywność metaboliczną mutantu w hodowlach, w których jedynym źródłem azotu była guanozyna i kwas γ -aminomasłowy. W warunkach obfitych w jony amonowe, mutant Δ *msmeg_0432* nie wykazywał żadnych zmian we wzroście, przeżywalności oraz profilu transkrypcyjnym.

Białko Rv0260c/Msmeg_0432 pierwotnie opisano jako bifunkcjonalne, zawierające w swojej budowie domenę C-terminalną odpowiedzialną za wiązanie się z DNA oraz N-terminalną HemD o właściwościach syntazy uroporfirynogenowej III. Badania na homologicznym białku u *S. coelicolor* wykazały, że domena HemD regulatora jest nieaktywna (Amin i wsp., 2012). U *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* zidentyfikowano inne paralogi HemD, białka Rv0511 i Msmeg_0954, które mogą pełnić rolę aktywnego enzymu. Co ciekawe, analiza transkryptomu wykazała, że Msmeg_0432 z wysokim powinowactwem reguluje ekspresję skróconej bakteryjnej hemoglobiny trHbN kodowanej przez gen

msmeg_5765. Badania na *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* i *M. bovis* potwierdzają, że trHbN oraz inna skrócona hemoglobina trHbO biorą udział w adaptacji do stresu nitrozacyjnego i przyczyniają się do przeżycia mykobakterii w makrofagach. Wykazują one aktywność dioksygenaz tlenku azotu i chronią oddychanie tlenowe przed działaniem rodników (Ouellet i wsp., 2002; Pawaria i wsp., 2008; Savard i wsp., 2011; Joseph i wsp., 2012). Biorąc pod uwagę dane transkryptomyczne pokazujące zależność ekspresji trHbN od białka *Msmeg_0432*, można stwierdzić, że *Msmeg_0432* jest ważnym czynnikiem modulującym odpowiedź komórki na stres nitrozacyjny. Reaktywne formy azotu stanowią istotny element interakcji *M. tuberculosis* z makrofagami, zatem niewykluczony jest także udział regulatora w wewnątrzkomórkowym przeżyciu prątków gruźlicy. Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza przeżywalności mutantu $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* w obecności związku DETA-NO, generującego reaktywne formy azotu nie wykazała wpływu rodników na żywotność patogenu. Interesujące wydają się jednak obserwacje dotyczące przeżywalności mutantu $\Delta rv0260c$ w obecności menadionu, z których wynika, że komórka pozbawiona funkcjonalnego białka jest mniej wrażliwa na reaktywne formy tlenu. Przeprowadzone badania wskazują zatem na zaangażowanie regulatora w odpowiedź zarówno na stres nitrozacyjny jak i oksydacyjny. Ocena znaczenia białka *Rv0260c* w patogenezie *M. tuberculosis* oraz adaptacji do warunków stresowych wymaga dodatkowych badań, które wybiegają poza plan pracy doktorskiej. Analizy transkrypcyjne szczepu mutantu $\Delta rv0260c$ hodowanego w obecności menadionu oraz bakterii izolowanych z komórek makrofagów po infekcji mogłyby wyjaśnić molekularne mechanizmy odpowiadające za obserwowane fenotypy oraz potwierdzić potencjalny wpływ regulatora na zjadliwość prątków.

Obserwowane zmiany transkrypcyjne wynikające z aktywności białka *Msmeg_0432* jako aktywatora transkrypcji były jeszcze bardziej nasilone w komórkach *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego globalnego regulatora metabolizmu azotu *Msmeg_5784*. Wprowadzenie do komórki mutantu $\Delta msmeg_5784$ funkcjonalnego genu *msmeg_0432* pod silnym promotorem nie przywróciło ekspresji regulonu kontrolowanego przez białko *Msmeg_0432*, co wskazuje, że za obserwowane zjawiska odpowiedzialna była współregulacja, a nie oddzielna aktywność regulatorów *Msmeg_0432* i *Msmeg_5784*. Taki mechanizm został zasugerowany w badaniach na *S. coelicolor* (Amin i wsp., 2012). Przeprowadzone w niniejszej pracy badania pozwoliły uzyskać dowody wspierające tę hipotezę. Na podstawie analizy sekwencji regionów promotorowych genów regulowanych przez białko *Msmeg_0432* zidentyfikowano motywy DNA rozpoznawane zarówno przez białko *Msmeg_0432* jak i *Msmeg_5784*, z miejscem startu transkrypcji znajdującym się

poniżej sekwencji rozpoznawanej przez regulator Msmeg_5784 (Rycina 5.12.). Badanie oddziaływania rekombinowanych białek MBP-Msmeg_0432 i His-Msmeg_5784 z sekwencjami wybranych promotorów regulonu Msmeg_0432 wykazało, że wiązanie niektórych fragmentów DNA przez białko Msmeg_0432 było możliwe jedynie w obecności obu białek. Analiza interakcji pomiędzy badanymi białkami z wykorzystaniem białek rekombinowanych wykazała słabe oddziaływanie czynników transkrypcyjnych, jednak przyczyną uzyskanego wyniku może być stosunkowo duży rozmiar etykiety MBP obecnej w strukturze rekombinowanego białka Msmeg_0432, uniemożliwiający utworzenie heterodimeru. Zebrane dowody wskazują na współregulację, w której białko Msmeg_0432 jest pośrednikiem w aktywacji transkrypcji zależnej od białka Msmeg_5784.

W trakcie analiz z udziałem mutanta Δ msmeg_5784 zaobserwowano podobieństwo domeny wiążącej DNA białka Msmeg_5784/Rv0818 do domeny białka MtrA u *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Motywy rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne są niemal identyczne, co może wskazywać na regulację podobnego zestawu genów. Badania na *M. tuberculosis* wykazały, że regulator MtrA biorący udział w podziale komórki wiąże się do sekwencji promotorowej genu *nirB* (reduktaza azotynów), regulowanego w warunkach głodu azotowego przez białka Msmeg_0432 i Msmeg_5784 (Haydel i Clark-Curtiss, 2004; Minch i wsp., 2015; Purushotham i wsp., 2015). Obserwacje te tylko w małym stopniu pokazują wciąż słabo poznaną złożoność globalnej regulacji, wymagającej wzajemnych oddziaływań czynników transkrypcyjnych.

Dzięki szybkim procesom adaptacji prątki są w stanie wyłączyć na lata swój metabolizm i przetrwać w uspieniu wewnątrz makrofagów bądź zmian ziarniniakowatych do czasu reaktywacji pierwotnego zakażenia, występującej najczęściej podczas osłabienia odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Konieczne jest więc poznanie procesów patogenezy podlegających często regulacji przez kinazy i białka regulatorowe zaangażowane w transdukcję sygnału. Zastosowane w niniejszej pracy analizy pozwoliły przybliżyć rolę jednego z dwóch badanych „sierocych” białek regulatorowych w szlakach metabolizmu azotu, niezbędnego dla wzrostu bakterii pierwiastka oraz składnika białek i kwasów nukleinowych. Badania wykazały, że u *M. smegmatis* regulator Msmeg_0432 wraz z białkiem Msmeg_5784 jest niezbędny do asymilacji azotanów i azotynów, ponadto kontroluje ekspresję bakteryjnej hemoglobiny biorącej udział w detoksyfikacji komórki z tlenu azotu. Intrygująca jest także znacząco wyższa w stosunku do szczepu dzikiego przeżywalność mutanta Δ rv0260c *M. tuberculosis* w obecności reaktywnych form tlenu. Biorąc pod uwagę przedstawione analizy istnieją przesłanki, aby podejrzewać, że regulator ten odgrywa rolę

w adaptacji prątków do wewnątrzkomórkowego środowiska, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów.

7. Wnioski

1. Białka Msmeg_0432, Rv0260c oraz Rv0195 nie są niezbędne dla wzrostu mykobakterii w standardowych podłożach mikrobiologicznych.

2. Białka Msmeg_0432 i Msmeg_5784 współregulują zdolność do asymilacji azotu pochodzącego z azotanów i azotynów u *M. smegmatis* gdyż:

- ✓ Ekspresja genów *nirB* i *nirD* kodujących reduktazy azotynów jest pod bezpośrednią kontrolą czynników transkrypcyjnych Msmeg_0432 oraz Msmeg_5784
- ✓ Mutant *M. smegmatis* pozbawiony zdolności syntezy funkcjonalnego białka Msmeg_0432 i/lub Msmeg_5784 nie asymiluje azotanu i azotynu sodu jako źródeł azotu
- ✓ Pozbawienie komórki *M. smegmatis* białka Msmeg_0432 skutkuje zaburzeniem szlaku konwersji azotynów do amoniaku
- ✓ Obecność białka Msmeg_5784 jest niezbędna do wiązania sekwencji promotorowych niektórych genów regulowanych przez białko Msmeg_0432
- ✓ Obecność białka Msmeg_0432 w komórkach *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego regulatora Msmeg_5784 jest niewystarczająca do regulacji genów bezpośrednio kontrolowanych przez czynnik transkrypcyjny Msmeg_0432
- ✓ W obrębie sekwencji promotorowych genów stanowiących regulon białka Msmeg_0432 znajdują się miejsca wiązania dla czynników transkrypcyjnych Msmeg_0432 i Msmeg_5784, z dobrze zachowanym regionem między motywami rozpoznawanymi przez te regulatory

3. Produkty genów *msmeg_0432* u *M. smegmatis* i *rv0260c* u *M. tuberculosis* są potencjalnie zaangażowane w odpowiedź komórki na stres nitrozacyjny i oksydacyjny gdyż:

- ✓ Białko Msmeg_0432 bezpośrednio reguluje transkrypcję skróconej bakteryjnej hemoglobiny trHbN biorącej udział w detoksyfikacji komórki *M. smegmatis* z tlenu azotu
- ✓ Obecność reaktywnych form tlenu w środowisku istotnie wpływa na zmiany w przeżywalności mutantu *M. tuberculosis* pozbawionego zdolności syntezy funkcjonalnego białka Rv0260c

8. Streszczenie

Terapia gruźlicy, choroby zabijającej każdego roku setki tysięcy ludzi na całym świecie stanowi ogromny problem ze względu na rosnącą lekooporność bakterii na tradycyjne chemioterapeutyki. Szybka adaptacja *M. tuberculosis* do warunków środowiska, utrzymanie niektórych życiowych funkcji oraz liczne procesy metaboliczne mykobakterii są kontrolowane przez dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału, składające się z zakotwiczonej w błonie komórkowej kinazy histydynowej oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego. Specyficzny sygnał ze środowiska prowadzi do autofosforylacji kinazy, a następnie przeniesienia reszty fosforanowej na wewnątrzkomórkowy regulator, który w odpowiedzi na sygnał reguluje ekspresję określonych genów. W komórkach *M. tuberculosis* obecne jest przynajmniej jedenaście dwuskładnikowych systemów oraz pięć „sierocych” białek regulatorowych, dla których partnerskie kinazy nie zostały dotąd zidentyfikowane. W niniejszej pracy analizie poddano dwa z takich regulatorów: białko Rv0195 i Rv0260c (Msmeg_0432 u *M. smegmatis*). Badania miały na celu określić funkcję badanych czynników transkrypcyjnych u *M. tuberculosis* oraz ocenić niezbędność genów je kodujących w komórce bakteryjnej. Do zaplanowanych eksperymentów wykorzystano szczepy *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*.

Oceny niezbędności genów *rv0195* i *rv0260c* w komórkach *M. tuberculosis* oraz genu *msmeg_432* w komórkach *M. smegmatis* dokonano przez próbę konstrukcji ukierunkowanych mutantów pozbawionych zdolności syntezy funkcjonalnych białek. Zastosowanie techniki opartej o rekombinację homologiczną pozwoliło uzyskać mutanty o pożądanym fenotypie ostatecznie potwierdzając, że badane geny nie są niezbędne do przeżycia mykobakterii.

Mutanty $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* poddano wstępnej analizie polegającej na ocenie wzrostu i przeżywalności szczepów w obecności reaktywnych form tlenu i azotu generowanych przez menadion i DETA-NO. Badania te wykazały, że mutant $\Delta rv0195$ hodowany z rodnikami nie wykazuje różnic w kinetyce wzrostu i żywotności w stosunku do szczepu dzikiego, jednakże hodowany bez związków charakteryzuje się osłabioną przeżywalnością w stacjonarnej fazie wzrostu oraz opóźnionym tworzeniem się kolonii na podłożu stałym. Mutant $\Delta rv0260c$ wykazał natomiast znacząco wyższą żywotność w obecności menadionu, porównując badany parametr między mutantem a szczepem dzikim hodowanym w takich samych warunkach.

W kolejnych badaniach, dwiema metodami oceniono wrażliwość szczepów $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki. W testach na

podłożu stałym oba mutanty wykazały zwiększoną w stosunku do szczepu dzikiego wrażliwość na streptomycynę, dihydrostreptomycynę i izoniazyd, jednak takich różnic nie zaobserwowano badając działanie antybiotyków w hodowlach płynnych.

Z wykorzystaniem metody immunodetekcji wykazano, że w warunkach optymalnych dla wzrostu prątków gruźlicy białko Rv0260c występuje w komórkach w bardzo małych ilościach, poniżej progu detekcji.

Dalsze analizy dotyczące regulatora Rv0260c przeprowadzono na modelu *M. smegmatis*, w genomie którego obecny jest gen kodujący białko Msmeg_0432, homolog czynnika transkrypcyjnego Rv0260c. Zaplanowane doświadczenia miały na celu poznanie funkcji białka w metabolizmie związków azotowych, uwzględniając rolę globalnego regulatora metabolizmu azotu Msmeg_5784, bezpośrednio kontrolującego ekspresję genu *msmeg_0432*. Zastosowane dla mutantu Δ *msmeg_0432* *M. smegmatis* analizy fenotypowe systemem BIOLOG oraz profilowanie transkrypcyjne szczepów Δ *msmeg_0432* i Δ *msmeg_5784* hodowanych w warunkach głodu azotowego wykazały udział białka Msmeg_0432 w asymilacji azotanów i azotynów oraz detoksyfikacji komórki z tlenu azotu. W hodowlach w podłożu płynnym potwierdzono, że mutant Δ *msmeg_0432* nie jest zdolny do wzrostu, kiedy jedynym źródłem azotu w środowisku jest azotan lub azotyn sodu. Oceniając stężenie azotynów i jonów amonowych w hodowlach z azotanem sodu dowiedziono, że mutant jest zdolny do redukcji azotanów, natomiast zaburzeniu w komórce uległy szlaki konwersji azotynów do amoniaku.

Globalna analiza transkryptomu pozwoliła określić regulon białka Msmeg_0432, kontrolowany przez czynnik transkrypcyjny w odpowiedzi na zużycie środowiskowego azotu. Wykazano także, że białko Msmeg_0432 wiąże się do sekwencji promotorowych regulowanych genów w pobliżu miejsca wiązania białka Msmeg_5784 wskazując na występowanie mechanizmu współregulacji. Badając oddziaływania rekombinowanych białek MBP-Msmeg_0432 i His-Msmeg_5784 z sekwencjami promotorowymi wybranych genów, stosując pojedyncze białka lub ich mieszaninę potwierdzono, że obecność globalnego regulatora jest wymagana do związania przez białko Msmeg_0432 niektórych sekwencji promotorowych. Analiza oddziaływania potencjalnych współregulatorów wykazała natomiast słabą interakcję między rekombinowanymi białkami.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że białko Msmeg_0432 jest niezbędne w komórkach *M. smegmatis* do asymilacji azotu pochodzącego z azotanów i azotynów. Biorąc pod uwagę analizy z udziałem mutantów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* istnieje także duże prawdopodobieństwo udziału regulatora w odpowiedzi komórki na stres nitrozacyjny

oraz oksydacyjny, warunków przypominających wewnątrzkomórkowe środowisko prątków gruźlicy.

9. Abstract

Tuberculosis, the infectious disease killing hundreds of thousands of people each year, has become a major worldwide problem because of the increasing drug resistance. Efficient adaptation of *M. tuberculosis* to environmental conditions, maintenance of vital functions along with multiple mycobacterial metabolic pathways are under the control of two component signal transduction systems (TCSs). A typical TCS consists of a histidine kinase anchored in cell membrane and a cytoplasmic regulatory protein. Environmental signals may cause kinase autophosphorylation followed by the transfer of a phosphate residue onto intracellular regulatory protein, which regulates the expression of specific genes in response to the stimulus. *M. tuberculosis* possesses at least eleven two component systems and five “orphan” regulatory proteins with unidentified kinases. In the present study two of such kind regulators were investigated: Rv0195 and Rv0260c (Msmeg_0432 in *M. smegmatis*). The main aim of the experiments was to determine the function of the investigated transcriptional factors in the physiology and pathogenesis of *M. tuberculosis*. The study was performed exploiting *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* as model organisms.

The analysis of studied here proteins was carried out using unmarked gene deletion mutants, which were constructed based on two-step recombination protocol. Contractions of such mutants confirmed that genes of interest are not essential for mycobacteria viability.

The growth kinetics and viability analysis of $\Delta rv0195$ *M. tuberculosis* mutant in the presence of oxygen and nitrogen radicals showed no difference in analyzed parameters when comparing the mutant to the wild type strain. On the other hand, the viability of $\Delta rv0195$ was significantly affected during the stationary phase of growth in liquid medium without stress inducers. Additionally, the strain displayed delayed colony formation on solid medium. The same experiments for $\Delta rv0260c$ strain revealed, that the mutant is significantly less sensitive to oxygen radicals than the wild type strain.

The sensitivity of mutants to antitubercular agents was assayed using two independent methods. Experiments on solid medium containing tested antibiotics demonstrated increased sensitivity of both $\Delta rv0195$ and $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* mutants to streptomycin, dihydrostreptomycin and isoniazid, however this effect was not observed when bacteria were cultured in liquid medium in the presence of drugs.

Further characteristics of Rv0260c regulatory protein was performed using *M. smegmatis* model, whose genome possess gene encoding Msmeg_0432 protein, homologues of Rv0260c regulator. The purpose of this part of work was to determine the

function of transcriptional factor in nitrogen metabolism including the role of global nitrogen regulator Msmeg_5784, which directly controls the expression of *msmeg_0432* gene. BIOLOG Phenotype Microarray analysis and RNA sequencing of Δ *msmeg_0432* and Δ *msmeg_5784* *M. smegmatis* mutants cultured under nitrogen-depletion conditions revealed, that the Msmeg_0432 protein is involved in assimilation of nitrogen derived from nitrates and nitrites. It was confirmed in liquid cultures containing sodium nitrate or sodium nitrite as a sole nitrogen source. The Δ *msmeg_0432* mutant exhibited impaired growth in relation to the wild type strain. Determination of concentration of nitrites and ammonium ions in cultures with sodium nitrate showed, that the mutant is capable of reducing nitrates to nitrites, however cannot convert nitrites to ammonia.

Global transcriptional analysis allowed to identify Msmeg_0432 regulon controlled in response to the utilization environmental nitrogen. It was observed that Msmeg_0432 protein binds to promoter sequences of regulated genes near the Msmeg_5784 protein binding site, indicating occurrence of co-regulation mechanism. DNA-protein interaction studies with the MBP-Msmeg_0432 and His-Msmeg_5784 recombinant proteins confirmed that the presence of global regulatory protein is required for the binding of some promoter sequences by the Msmeg_0432 transcriptional factor. The weak interactions between the investigated proteins were also detected.

Obtained results confirmed that the *msmeg_0432* gene is essential in *M. smegmatis* to assimilate nitrogen derived from nitrates and nitrites. The analyzes of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* mutants suggest that Rv0260c/Msmeg_0432 participate in cell response to nitrosative and oxidative stress, conditions resembling intracellular environment.

10. Literatura

1. Aguilar, D., E. Infante, et al. (2007). "Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain." *Clin Exp Immunol* 147(2): 330-338.
2. Alm, E., K. Huang, et al. (2006). "The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation." *PLoS Comput Biol* 2(11): e143.
3. Almassy, R. J., C. A. Janson, et al. (1986). "Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase." *Nature* 323(6086): 304-309.
4. Amin, R., J. Reuther, et al. (2012). "A novel GlnR target gene, *nnaR*, is involved in nitrate/nitrite assimilation in *Streptomyces coelicolor*." *Microbiology* 158(Pt 5): 1172-1182.
5. Amon, J., F. Titgemeyer, et al. (2009). "A genomic view on nitrogen metabolism and nitrogen control in mycobacteria." *J Mol Microbiol Biotechnol* 17(1): 20-29.
6. Amon, J., F. Titgemeyer, et al. (2010). "Common patterns - unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria." *FEMS Microbiol Rev* 34(4): 588-605.
7. Andersson, J. O. and A. J. Roger (2002). "Evolutionary analyses of the small subunit of glutamate synthase: gene order conservation, gene fusions, and prokaryote-to-eukaryote lateral gene transfers." *Eukaryot Cell* 1(2): 304-310.
8. Andrade, S. L. and O. Einsle (2007). "The Amt/Mep/Rh family of ammonium transport proteins." *Mol Membr Biol* 24(5-6): 357-365.
9. Antczak, M., K. Dadura, et al. (2017). "Prątki niegruźlicze - dlaczego tak trudno leczyć mykobakteriozy?" *KOSMOS* 66(1): 31-40.
10. Aseev, L. V., L. S. Koledinskaya, et al. (2016). "Regulation of Ribosomal Protein Operons *rplM-rpsI*, *rpmB-rpmG*, and *rplU-rpmA* at the Transcriptional and Translational Levels." *J Bacteriol* 198(18): 2494-2502.
11. Atkinson, M. R., E. S. Kamberov, et al. (1994). "Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC)." *J Biol Chem* 269(45): 28288-28293.

12. Atkinson, M. R. and A. J. Ninfa (1998). "Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 29(2): 431-447.
13. Balleza, E., L. N. Lopez-Bojorquez, et al. (2009). "Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description." *FEMS Microbiol Rev* 33(1): 133-151.
14. Beckers, G., L. Nolden, et al. (2001). "Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status." *Microbiology* 147(Pt 11): 2961-2970.
15. Beckers, G., J. Strosser, et al. (2005). "Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon." *Mol Microbiol* 58(2): 580-595.
16. Belyaeva, T. A., J. T. Wade, et al. (2000). "Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein." *Mol Microbiol* 36(1): 211-222.
17. Betts, J. C., P. T. Lukey, et al. (2002). "Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling." *Mol Microbiol* 43(3): 717-731.
18. Bretl, D. J., T. M. Bigley, et al. (2014). "The MprB extracytoplasmic domain negatively regulates activation of the *Mycobacterium tuberculosis* MprAB two-component system." *J Bacteriol* 196(2): 391-406.
19. Bretl, D. J., C. Demetriadou, et al. (2011). "Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*." *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4): 566-582.
20. Buchinger, S., J. Strosser, et al. (2009). "A combination of metabolome and transcriptome analyses reveals new targets of the *Corynebacterium glutamicum* nitrogen regulator AmtR." *J Biotechnol* 140(1-2): 68-74.
21. Bush, M. and R. Dixon (2012). "The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of sigma54-dependent transcription." *Microbiol Mol Biol Rev* 76(3): 497-529.
22. Cangelosi, G. A., J. S. Do, et al. (2006). "The two-component regulatory system mtrAB is required for morphotypic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*." *Antimicrob Agents Chemother* 50(2): 461-468.
23. Capra, E. J. and M. T. Laub (2012). "Evolution of two-component signal transduction systems." *Annu Rev Microbiol* 66: 325-347.

24. Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* 393(6685): 537-544.
25. Dadura, K., R. Plocinska, et al. (2017). "PdtA Deficiency Affects Resistance of *Mycobacteria* to Ribosome Targeting Antibiotics." *Front Microbiol* 8: 2145.
26. Dasgupta, N., V. Kapur, et al. (2000). "Characterization of a two-component system, devR-devS, of *Mycobacterium tuberculosis*." *Tuber Lung Dis* 80(3): 141-159.
27. Dorr, T., L. Alvarez, et al. (2016). "A cell wall damage response mediated by a sensor kinase/response regulator pair enables beta-lactam tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(2): 404-409.
28. Dubrac, S. and T. Msadek (2004). "Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 186(4): 1175-1181.
29. Ewann, F., M. Jackson, et al. (2002). "Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* 70(5): 2256-2263.
30. Fang, H., D. Yu, et al. (2013). "The LuxR family regulator Rv0195 modulates *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and virulence." *Tuberculosis (Edinb)* 93(4): 425-431.
31. Fink, D., N. Weisschuh, et al. (2002). "Two transcriptional regulators GlnR and GlnR2 are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Mol Microbiol* 46(2): 331-347.
32. Fol, M., A. Chauhan, et al. (2006). "Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator." *Mol Microbiol* 60(3): 643-657.
33. Forbes, B. A. (2017). "Mycobacterial Taxonomy." *J Clin Microbiol* 55(2): 380-383.
34. Freeman, Z. N., S. Dorus, et al. (2013). "The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence." *PLoS Pathog* 9(3): e1003201.
35. Frigui, W., D. Bottai, et al. (2008). "Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP." *PLoS Pathog* 4(2): e33.
36. Galperin, M. Y. (2006). "Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations." *J Bacteriol* 188(12): 4169-4182.
37. Garai, P., K. Chandra, et al. (2017). "Bacterial peptide transporters: Messengers of nutrition to virulence." *Virulence* 8(3): 297-309.

38. Gautam, U. S., S. Mehra, et al. (2015). "In-Vivo Gene Signatures of *Mycobacterium tuberculosis* in C3HeB/FeJ Mice." *PLoS One* 10(8): e0135208.
39. Glover, R. T., J. Kriakov, et al. (2007). "The two-component regulatory system *senX3-regX3* regulates phosphate-dependent gene expression in *Mycobacterium smegmatis*." *J Bacteriol* 189(15): 5495-5503.
40. Gonzalo-Asensio, J., S. Mostowy, et al. (2008). "PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence." *PLoS One* 3(10): e3496.
41. Gottschalk, S., I. Bygebjerg-Hove, et al. (2008). "The two-component system *CesRK* controls the transcriptional induction of cell envelope-related genes in *Listeria monocytogenes* in response to cell wall-acting antibiotics." *J Bacteriol* 190(13): 4772-4776.
42. Gouzy, A., Y. Poquet, et al. (2014). "Nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and virulence." *Nat Rev Microbiol* 12(11): 729-737.
43. Graham, J. E. and J. E. Clark-Curtiss (1999). "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11554-11559.
44. Gruswitz, F., J. O'Connell, 3rd, et al. (2007). "Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, *AmtB*, and the cytosolic regulatory protein, *GlnK*, at 1.96 Å." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 42-47.
45. Hallez, R., J. Mignolet, et al. (2007). "The asymmetric distribution of the essential histidine kinase *PdhS* indicates a differentiation event in *Brucella abortus*." *EMBO J* 26(5): 1444-1455.
46. Hanssler, E., T. Muller, et al. (2009). "A game with many players: control of *gdh* transcription in *Corynebacterium glutamicum*." *J Biotechnol* 142(2): 114-122.
47. Harper, C. J., D. Hayward, et al. (2010). "Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*." *BMC Microbiol* 10: 138.
48. Harth, G., D. L. Clemens, et al. (1994). "Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9342-9346.
49. Harth, G., S. Maslesa-Galic, et al. (2005). "All four *Mycobacterium tuberculosis* *glnA* genes encode glutamine synthetase activities but only *GlnA1* is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis." *Mol Microbiol* 58(4): 1157-1172.

50. Haydel, S. E., W. H. Benjamin, Jr., et al. (2002). "Expression, autoregulation, and DNA binding properties of the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator." *J Bacteriol* 184(8): 2192-2203.
51. Haydel, S. E. and J. E. Clark-Curtiss (2004). "Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages." *FEMS Microbiol Lett* 236(2): 341-347.
52. Haydel, S. E., V. Malhotra, et al. (2012). "The prrAB two-component system is essential for *Mycobacterium tuberculosis* viability and is induced under nitrogen-limiting conditions." *J Bacteriol* 194(2): 354-361.
53. He, H. J., R. Hovey, et al. (2006). "MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* 188(6): 2134-2143.
54. Hecht, G. B., T. Lane, et al. (1995). "An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*." *EMBO J* 14(16): 3915-3924.
55. Hesketh, A., D. Fink, et al. (2002). "The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria." *Mol Microbiol* 46(2): 319-330.
56. Jenkins, V. A., G. R. Barton, et al. (2013). "Genome wide analysis of the complete GlnR nitrogen-response regulon in *Mycobacterium smegmatis*." *BMC Genomics* 14: 301.
57. Jenkins, V. A., B. D. Robertson, et al. (2012). "Aspartate D48 is essential for the GlnR-mediated transcriptional response to nitrogen limitation in *Mycobacterium smegmatis*." *FEMS Microbiol Lett* 330(1): 38-45.
58. Jessberger, N., Y. Lu, et al. (2013). "Nitrogen starvation-induced transcriptome alterations and influence of transcription regulator mutants in *Mycobacterium smegmatis*." *BMC Res Notes* 6: 482.
59. Joseph, S. V., G. K. Madhavalatha, et al. (2012). "Comparative analysis of mycobacterial truncated hemoglobin promoters and the groEL2 promoter in free-living and intracellular mycobacteria." *Appl Environ Microbiol* 78(18): 6499-6506.
60. Kim, S. H. and B. G. Kim (2016). "NAD(+)-specific glutamate dehydrogenase (EC.1.4.1.2) in *Streptomyces coelicolor*; in vivo characterization and the implication for nutrient-dependent secondary metabolism." *Appl Microbiol Biotechnol* 100(12): 5527-5536.

61. Klumpp, S. and T. Hwa (2014). "Bacterial growth: global effects on gene expression, growth feedback and proteome partition." *Curr Opin Biotechnol* 28: 96-102.
62. Koretke, K. K., A. N. Lupas, et al. (2000). "Evolution of two-component signal transduction." *Mol Biol Evol* 17(12): 1956-1970.
63. Kumar, A., J. S. Deshane, et al. (2008). "Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the Mycobacterium tuberculosis dormancy regulon." *J Biol Chem* 283(26): 18032-18039.
64. Liao, C. H., L. Yao, et al. (2015). "Nitrogen regulator GlnR controls uptake and utilization of non-phosphotransferase-system carbon sources in actinomycetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(51): 15630-15635.
65. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
66. Malhotra, V., R. Agrawal, et al. (2015). "Mycobacterium tuberculosis response regulators, DevR and NarL, interact in vivo and co-regulate gene expression during aerobic nitrate metabolism." *J Biol Chem* 290(13): 8294-8309.
67. Manabe, Y. C., B. J. Saviola, et al. (1999). "Attenuation of virulence in Mycobacterium tuberculosis expressing a constitutively active iron repressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12844-12848.
68. Marszalek, M., A. Planas, et al. (2014). "Two-Component Systems of Mycobacterium tuberculosis as potential targets for drug development." *Afinidad* 71(567): 172-178.
69. Martin, C., A. Williams, et al. (2006). "The live Mycobacterium tuberculosis phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs." *Vaccine* 24(17): 3408-3419.
70. Martinez-Antonio, A. and J. Collado-Vides (2003). "Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria." *Curr Opin Microbiol* 6(5): 482-489.
71. Martinez-Hackert, E. and A. M. Stock (1997). "The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor." *Structure* 5(1): 109-124.
72. Martinez, B., A. L. Zomer, et al. (2007). "Cell envelope stress induced by the bacteriocin Lcn972 is sensed by the Lactococcal two-component system CesSR." *Mol Microbiol* 64(2): 473-486.
73. Merrick, M. J. and R. A. Edwards (1995). "Nitrogen control in bacteria." *Microbiol Rev* 59(4): 604-622.

74. Minambres, B., E. R. Olivera, et al. (2000). "A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*." *J Biol Chem* 275(50): 39529-39542.
75. Minch, K. J., T. R. Rustad, et al. (2015). "The DNA-binding network of *Mycobacterium tuberculosis*." *Nat Commun* 6: 5829.
76. Mingeot-Leclercq, M. P., Y. Glupczynski, et al. (1999). "Aminoglycosides: activity and resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 43(4): 727-737.
77. Morth, J. P., V. Feng, et al. (2004). "The crystal and solution structure of a putative transcriptional antiterminator from *Mycobacterium tuberculosis*." *Structure* 12(9): 1595-1605.
78. Morth, J. P., S. Gosmann, et al. (2005). "A novel two-component system found in *Mycobacterium tuberculosis*." *FEBS Lett* 579(19): 4145-4148.
79. Murray, D. S., N. Chinnam, et al. (2013). "Structures of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase dodecamer reveal large intersubunit catalytic conformational changes linked to a unique feedback inhibition mechanism." *J Biol Chem* 288(50): 35801-35811.
80. Muthaiyan, A., J. A. Silverman, et al. (2008). "Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization." *Antimicrob Agents Chemother* 52(3): 980-990.
81. O'Hare, H. M., R. Duran, et al. (2008). "Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria." *Mol Microbiol* 70(6): 1408-1423.
82. Opechowska, M. and S. Bielecki (2014). "The role of alternative sigma factor S (sigma(s)) and sigma factor B (sigma(B)) in bacterial cell stress response and their regulation." *Postepy Mikrobiologii* 53(4): 305-317.
83. Ouellet, H., Y. Ouellet, et al. (2002). "Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 5902-5907.
84. Paget, M. S. (2015). "Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution." *Biomolecules* 5(3): 1245-1265.
85. Palanca, C. and V. Rubio (2016). "Structure of AmtR, the global nitrogen regulator of *Corynebacterium glutamicum*, in free and DNA-bound forms." *FEBS J* 283(6): 1039-1059.

86. Pang, X., B. Samten, et al. (2013). "MprAB regulates the espA operon in *Mycobacterium tuberculosis* and modulates ESX-1 function and host cytokine response." *J Bacteriol* 195(1): 66-75.
87. Parish, T. (2014). "Two-Component Regulatory Systems of *Mycobacteria*." *Microbiol Spectr* 2(1): MGM2-0010-2013.
88. Parish, T., D. A. Smith, et al. (2003). "Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* 71(3): 1134-1140.
89. Parish, T., D. A. Smith, et al. (2003). "The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence." *Microbiology* 149(Pt 6): 1423-1435.
90. Parish, T. and N. G. Stoker (2000). "Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement." *Microbiology* 146 (Pt 8): 1969-1975.
91. Pawaria, S., A. Lama, et al. (2008). "Responses of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin promoters to in vitro and in vivo growth conditions." *Appl Environ Microbiol* 74(11): 3512-3522.
92. Perez, J. C. and E. A. Groisman (2009). "Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria." *Cell* 138(2): 233-244.
93. Petridis, M., C. Vickers, et al. (2016). "Structure and Function of AmtR in *Mycobacterium smegmatis*: Implications for Post-Transcriptional Regulation of Urea Metabolism through a Small Antisense RNA." *J Mol Biol* 428(21): 4315-4329.
94. Pfyffer, G. E. and F. Palicova (2011). *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. C. K. Versalovic J, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (ed). Washington, DC, ASM Press: 472-502.
95. Pogliano, J., A. S. Lynch, et al. (1997). "Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system." *Genes Dev* 11(9): 1169-1182.
96. Pullan, S. T., G. Chandra, et al. (2011). "Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes." *BMC Genomics* 12: 175.
97. Purushotham, G., K. B. Sarva, et al. (2015). "*Mycobacterium tuberculosis* oriC sequestration by MtrA response regulator." *Mol Microbiol* 98(3): 586-604.

98. Quon, K. C., G. T. Marczyński, et al. (1996). "Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein." *Cell* 84(1): 83-93.
99. Rehm, N., T. Georgi, et al. (2010). "L-Glutamine as a nitrogen source for *Corynebacterium glutamicum*: derepression of the AmtR regulon and implications for nitrogen sensing." *Microbiology* 156(Pt 10): 3180-3193.
100. Reitzer, L. (2003). "Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*." *Annu Rev Microbiol* 57: 155-176.
101. Rexer, H. U., T. Schaberle, et al. (2006). "Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Arch Microbiol* 186(6): 447-458.
102. Rivera-Gomez, N., M. A. Martinez-Nunez, et al. (2017). "Dissecting the protein architecture of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea." *Microbiology* 163(8): 1167-1178.
103. Sakamoto, N., A. M. Kotre, et al. (1975). "Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties." *J Bacteriol* 124(2): 775-783.
104. Sasseti, C. M., D. H. Boyd, et al. (2003). "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis." *Mol Microbiol* 48(1): 77-84.
105. Savard, P. Y., R. Daigle, et al. (2011). "Structure and dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* truncated hemoglobin N: insights from NMR spectroscopy and molecular dynamics simulations." *Biochemistry* 50(51): 11121-11130.
106. Schnappinger, D., S. Ehrt, et al. (2003). "Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment." *J Exp Med* 198(5): 693-704.
107. Schreier, H. J., S. M. Caruso, et al. (2000). "Control of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase expression by *glnR* from *Staphylococcus aureus*." *Curr Microbiol* 41(6): 425-429.
108. Schroder, I., S. Darie, et al. (1993). "Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (*narGHJI*) operon by NarL and Fnr requires integration host factor." *J Biol Chem* 268(2): 771-774.
109. Sharma, D., A. Bose, et al. (2006). "Expression of mycobacterial cell division protein, FtsZ, and dormancy proteins, DevR and Acr, within lung granulomas throughout guinea pig infection." *FEMS Immunol Med Microbiol* 48(3): 329-336.

110. Sherman, D. R., M. Voskuil, et al. (2001). "Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7534-7539.
111. Shrivastava, R., D. R. Das, et al. (2006). "Functional insights from the molecular modelling of a novel two-component system." *Biochem Biophys Res Commun* 344(4): 1327-1333.
112. Steyn, A. J., J. Joseph, et al. (2003). "Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family." *Mol Microbiol* 47(4): 1075-1089.
113. Stock, A. M., V. L. Robinson, et al. (2000). "Two-component signal transduction." *Annu Rev Biochem* 69: 183-215.
114. Strosser, J., A. Ludke, et al. (2004). "Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* 54(1): 132-147.
115. Thomas, G., G. Coutts, et al. (2000). "The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes." *Trends Genet* 16(1): 11-14.
116. Tiffert, Y., P. Supra, et al. (2008). "The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes." *Mol Microbiol* 67(4): 861-880.
117. Tischler, A. D., R. L. Leistikow, et al. (2013). "*Mycobacterium tuberculosis* requires phosphate-responsive gene regulation to resist host immunity." *Infect Immun* 81(1): 317-328.
118. Traag, B. A., A. Driks, et al. (2010). "Do mycobacteria produce endospores?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(2): 878-881.
119. Unissa, A. N., S. Subbian, et al. (2016). "Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Genet Evol* 45: 474-492.
120. van den Heuvel, R. H., B. Curti, et al. (2004). "Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate." *Cell Mol Life Sci* 61(6): 669-681.
121. Veronese, F. M., J. F. Nyc, et al. (1974). "Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. I. Purification and molecular properties." *J Biol Chem* 249(24): 7922-7928.
122. Voskuil, M. I., D. Schnappinger, et al. (2003). "Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program." *J Exp Med* 198(5): 705-713.

123. Walters, S. B., E. Dubnau, et al. (2006). "The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis." *Mol Microbiol* 60(2): 312-330.
124. Wernisch, L., S. L. Kendall, et al. (2003). "Analysis of whole-genome microarray replicates using mixed models." *Bioinformatics* 19(1): 53-61.
125. Williams, K. J., M. H. Bennett, et al. (2013). "Adenylation of mycobacterial Glnk (PII) protein is induced by nitrogen limitation." *Tuberculosis (Edinb)* 93(2): 198-206.
126. Williams, K. J., V. A. Jenkins, et al. (2015). "Deciphering the metabolic response of *Mycobacterium tuberculosis* to nitrogen stress." *Mol Microbiol* 97(6): 1142-1157.
127. Williams, K. J., G. Joyce, et al. (2010). "Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors." *Plasmid* 64(2): 69-73.
128. Wolanin, P. M., P. A. Thomason, et al. (2002). "Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom." *Genome Biol* 3(10): REVIEWS3013.
129. Xu, Y., D. You, et al. (2017). "Nitrogen regulator GlnR directly controls transcription of genes encoding lysine deacetylases in Actinobacteria." *Microbiology* 163(11): 1702-1710.
130. Yamamoto, K., B. Low, et al. (2001). "The *Mycobacterium avium*-intracellulare complex dnaB locus and protein intein splicing." *Biochem Biophys Res Commun* 280(3): 898-903.
131. Yoshida, T., L. Qin, et al. (2006). "Transcription regulation of ompF and ompC by a single transcription factor, OmpR." *J Biol Chem* 281(25): 17114-17123.
132. Zahrt, T. C. and V. Deretic (2000). "An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* 182(13): 3832-3838.
133. Zahrt, T. C. and V. Deretic (2001). "*Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12706-12711.