

Stacjonarne Studia Doktoranckie Mikrobiologii,  
Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

## **Karolina Ambroziak**

### **Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdtaS/PdtaR w regulacji procesów metabolicznych u mykobakterii.**

The two-component signal transduction  
system PdtaS/PdtaR in regulation of metabolic  
processes in mycobacteria.

Praca doktorska wykonana w Instytucie  
Biologii Medycznej PAN

Promotor:

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Promotor pomocniczy:

Dr Renata Płocińska

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

## A. Spis treści

<b>1. Wstęp</b> .....	<b>9</b>
1.1. Charakterystyka rodzaju <i>Mycobacterium</i> .....	9
1.2. Epidemiologia bakterii z rodzaju <i>Mycobacterium</i> .....	9
1.3. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs) u <i>Mycobacterium</i> .....	11
1.3.1. Wprowadzenie .....	11
1.3.2. Charakterystyka kinaz histydynowych (HK) .....	11
1.3.3. Charakterystyka regulatorów odpowiedzi (RR) .....	12
1.3.4. Mechanizm działania TCSs .....	12
1.3.5. Charakterystyka TCS u mykobakterii.....	13
1.4. Niekanoniczne systemy transdukcji sygnału u mykobakterii.....	16
1.4.1. Sieroce kinazy i białka regulatorowe.....	16
1.4.2. Białka regulatorowe bez domeny wiążącej DNA.....	17
1.4.3. Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdtA/S/PdtA/R .....	18
1.5. Lekooporność gruźlicy.....	22
1.5.1. Wprowadzenie .....	22
1.5.2. Epidemiologia gruźlicy lekoopornej .....	23
1.6. Leczenie gruźlicy.....	23
1.6.1. Leki przeciwgruźlicze .....	23
1.6.2. Leczenie gruźlicy.....	24
1.7. Antybiotyki aminoglikozydowe w leczeniu gruźlicy .....	26
1.8. Mechanizmy lekooporności prątków .....	27
1.8.1. Wprowadzenie .....	27
1.8.2. Przepuszczalność ściany komórkowej.....	29
1.8.3. Modyfikacja miejsca wiązania leku .....	30
1.8.4. Mimikra molekularna .....	30
1.8.5. Modyfikacja leku .....	31
1.8.6. Degradacja leku.....	31
1.8.7. Pompy oporności wielolekowej (ang. efflux pumps) .....	31
1.8.8. Aktywność bakteriobójcza leków a stres oksydacyjny u prątków .....	32

1.8.9. Tolerancja fenotypowa.....	32
1.9. Zależność między regulacją transkrypcji mykobakterii a opornością na antybiotyki. ....	33
<b>2. Cel Pracy.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Materiały.....</b>	<b>37</b>
3.1. Szczepy bakteryjne .....	37
3.2. Podłoża mikrobiologiczne .....	37
3.3. Substancje dodawane do podłoży .....	38
3.4. Wektory plazmidowe .....	38
3.5. Syntetyczne oligonukleotydy .....	44
3.6. Enzymy .....	46
3.7. Mieszaniny reakcyjne .....	47
3.8. Bufory i roztwory.....	48
3.8.1. Bufory użyte do przygotowania komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i> .....	48
3.8.2. Bufory i roztwory użyte do hybrydyzacji metodą Southern Blot .....	48
3.8.3. Bufor do badania aktywności $\beta$ - galaktozydazy .....	50
3.8.4. Bufory do elektroforezy .....	50
3.8.5. Bufory do oczyszczania białek.....	50
3.8.6. Inne bufory i roztwory.....	51
3.9. Żele użyte w procesie elektroforezy .....	52
3.9.1. Żel agarozowy do elektroforezy .....	52
3.9.2. Żel poliakrylamidowy do pionowej elektroforezy białek .....	52
3.10. Barwniki obciążające .....	52
3.11. Markery wielkości .....	53
3.12. Zestawy komercyjne wykorzystane w pracy .....	53
3.13. Pozostałe odczynniki i materiały .....	54
3.14. Aparatura .....	55
<b>4. Metody .....</b>	<b>56</b>
4.1. Hodowle bakteryjne.....	56
4.2. Izolacja plazmidowego DNA z komórek <i>E. coli</i> .....	56
4.3. Izolacja chromosomalnego DNA z komórek <i>M. smegmatis</i> .....	57
4.4. Amplifikacja DNA przy pomocy reakcji PCR .....	57
4.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi .....	58

4.6. Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym .....	58
4.7. Elucja DNA z żelu agarozowego .....	58
4.8. Precypitacja DNA.....	58
4.9. Łączenie fragmentów DNA.....	59
4.10. Oczyszczanie produktów PCR.....	59
4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA .....	59
4.12. Sekwencjonowanie fragmentów DNA .....	59
4.13. Transformacja szczepów <i>E. coli</i> .....	60
4.14. Elektrotransformacja komórek <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i> .....	60
4.15. Konstrukcja wektorów do nadekspresji rekombinowanych białek .....	60
4.16. Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek <i>E. coli</i> BL21 .....	61
4.17. Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek <i>M. smegmatis mc<sup>2</sup>155</i> .....	61
4.18. Elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS – PAGE).....	62
4.19. Autofosforylacja białka i fosfotransfer .....	62
4.20. Konstrukcja wektora do rekombinacji homologicznej .....	63
4.21. Otrzymywanie mutantów SCO i DCO .....	63
4.22. Poszukiwanie mutantów SCO i DCO.....	64
4.23. Konstrukcja wektorów integracyjnych wykorzystywanych do komplementacji mutantów SCO .....	65
4.24. Hybrydyzacja metodą Southern Blot .....	66
4.25. Analiza cech fenotypowych komórek szczepów <i>Mycobacterium smegmatis</i> z wykorzystaniem macierzy fenotypowych firmy BIOLOG .....	66
4.26. Analiza wrażliwości komórek mykobakterii na wybrane antybiotyki z wykorzystaniem testu kropkowego .....	67
4.27. Analiza przeżywalności komórek mykobakterii - CFU.....	68
4.28. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost badanych szczepów w obecności wybranych antybiotyków.....	68
4.29. Analiza wnikania streptomycyny do komórek <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	69
4.30. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Alamar Blue .....	69
4.31. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazoliowego (TTC).....	70
4.32. Izolacja RNA z komórek <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i> .....	70
4.33. Globalna analiza transkryptomu .....	71
4.34. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern.....	71
4.35. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qRT - PCR).....	72

4.36. Analiza rybosomów <i>M. smegmatis</i> .....	73
4.37. Analiza proteomiczna rybosomów <i>M. smegmatis</i> .....	73
4.38. Badanie aktywności $\beta$ - galaktozydazy .....	74
4.39. Badanie aktywności katalazy.....	74
4.40. Analiza statystyczna .....	75
<b>5. Wyniki .....</b>	<b>76</b>
5.1. PdtaS jako kinaza histydynowa jest zdolne do fosforylacji białka partnerskiego PdtaR.....	76
5.1.1. Charakterystyka białek dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału PdtaS/PdtaR .....	76
5.1.2. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych zdolnych do nadprodukcji rekombinowanego białka PdtaS i PdtaR.....	77
5.1.3. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek PdtaS i PdtaR.....	77
5.1.4. Autofosforylacja kinazy histydynowej PdtaS i fosfotransfer do regulatora odpowiedzi PdtaR .....	78
5.2. Funkcjonalny gen <i>pdtaS</i> nie jest niezbędny do wzrostu i przeżycia komórek <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i> .....	79
5.2.1. Konstrukcja wektorów plazmidowych użytych podczas rekombinacji homologicznej..	79
5.2.2. Pozbawienie komórek <i>M. smegmatis</i> i <i>M. tuberculosis</i> funkcjonalnego genu <i>pdtaS</i> ....	80
5.2.3. Analiza tempa wzrostu i przeżywalności szczepów <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i> pozbawionych funkcjonalnego genu <i>pdtaS</i> .....	83
5.3. Analiza przeżywalności szczepów $\Delta$ <i>pdtaS</i> <i>M. smegmatis</i> oraz $\Delta$ <i>pdtaS</i> <i>M. tuberculosis</i> w obecności reaktywnych form tlenu i azotu .....	84
5.4. Charakterystyka komórek $\Delta$ <i>pdtaS</i> z wykorzystaniem macierzy fenotypowych.....	85
5.5. Analiza wrażliwości szczepu <i>M. smegmatis</i> pozbawionego funkcjonalnego genu <i>pdtaS</i> na antybiotyki ukierunkowane na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego .....	88
5.5.1. Analiza wrażliwości komórek mykobakterii na wybrane antybiotyki z wykorzystaniem testu kropkowego (ang. spot assay) na podłożu stałym .....	88
5.5.2. Analiza przeżywalności komórek <i>M. smegmatis</i> hodowanych w obecności antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego.....	90
5.5.3. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost szczepów w obecności wybranych antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego	92
5.6. Analiza funkcjonowania łańcucha oddechowego <i>M. smegmatis</i> .....	93

5.6.1. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem mikroplótkowego testu w obecności Alamar Blue .....	93
5.6.2. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC) .....	94
5.6.3. Analiza wnikania streptomycyny do komórek <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	95
5.7. Analiza poziomu ekspresji rRNA w komórkach mutantu $\Delta pdtA$ <i>M. smegmatis</i> .....	96
5.7.1. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern .....	97
5.7.2. Analiza poziomu transkryptów metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT - PCR) .....	98
5.8. Określenie stosunku ilościowego 30S:50S u $\Delta pdtA$ i szczepu dzikiego <i>M. smegmatis</i> .....	99
5.8.1. Analiza rybosomów bakteryjnych <i>M. smegmatis</i> - rozdział rybosomów w gradiencie sacharozy.....	99
5.8.2. Analiza proteomiczna rybosomów <i>M. smegmatis</i> .....	100
5.8.3. Badanie aktywności $\beta$ - galaktozydazy .....	101
5.9. Brak białka PdtA, a globalna odpowiedź transkrypcyjna .....	103
5.9.1. Globalna analiza transkrypcyjna mutantu $\Delta pdtA$ <i>M. smegmatis</i> oraz $\Delta pdtA$ <i>M. tuberculosis</i> .....	103
5.9.2. Analiza wrażliwości zmutowanego szczepu $\Delta pdtA$ <i>M. smegmatis</i> na wybrane tuberculostryki – MIC .....	105
5.9.3. Analiza wrażliwości szczepów <i>M. smegmatis</i> na izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej – MIC.....	107
5.9.4. Oznaczenie aktywności katalazy w komórkach szczepu $\Delta pdtA$ <i>M. smegmatis</i> .....	108
5.9.5. Analiza obecności mutacji warunkujących oporność na izoniazyd w szczepie $\Delta pdtA$ <i>M. smegmatis</i> .....	108
<b>6. Dyskusja .....</b>	<b>110</b>
<b>7. Wnioski.....</b>	<b>119</b>
<b>8. Streszczenie .....</b>	<b>120</b>
<b>9. Abstract.....</b>	<b>122</b>
<b>10. Literatura.....</b>	<b>124</b>

## **B. Wykaz stosowanych skrótów**

AIDS - Zespół nabytego niedoboru odporności (*ang. acquired immunodeficiency syndrome*)

ATS - Amerykańskie Towarzystwo Chorób Klatki Piersiowej (*ang. American Thoracic Society*)

CFU - Liczba jednostek tworzących kolonie (*ang. colony forming unit*)

DCO - Podwójne krzyżowe rekombinanty (*ang. double cross over recombinants*)

DNA - Kwas deoksyrybonukleinowy (*ang. deoxyribonucleic acid*)

HIV - Ludzki wirus niedoboru odporności, ludzki wirus upośledzenia odporności (*ang. human immunodeficiency virus*)

HK – Kinaza histydynowa (*ang. histidine kinase*)

IPTG - Izopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozyd

MIC - Minimalne stężenie hamujące (*ang. minimal inhibitory concentration*)

MDR -TB - Gruźlica wielolekooporna (*ang. multidrug-resistant*)

MOTT - Prątki inne niż *Mycobacterium tuberculosis* (*ang. mycobacteria other than tuberculosis*)

MTBC - *Mycobacterium tuberculosis* complex

NTM – Prątki nie gruźlicze (*ang. nontuberculous mycobacteria*)

OPNG - o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd

PRM - Czerwień pirogalolowa (*ang. acidified pyrogallol red*)

RR-TB – Gruźlica oporna na ryfampicynę (*ang. rifampicin resistant tuberculosis*)

RR – Regulator odpowiedzi (*ang. response regulator*)

SNP - Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang. single nucleotide polymorphism*)

SCID- Ciężkie złożone niedobory odporności (*ang. severe combined immunodeficiency*)

SCO - pojedyncze krzyżowe rekombinanty (*ang. single cross over recombinants*)

SSR - system miejscowo-specyficznej rekombinacji (*ang. site specific recombination*)

TCSs – Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (*ang. two-component transduction systems*)

WHO -Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization*)

XDR – TB - Gruźlica wielolekooporna o rozszerzonej lekooporności (*ang. extensively drug-resistant*)



# 1. Wstęp

## 1.1. Charakterystyka rodzaju *Mycobacterium*

Zgodnie z klasyfikacją mykobakterie należą do królestwa Procaryota, klasy Shizomycetes, rzędu Actinomycetales, rodziny Mycobacteriaceae i rodzaju *Mycobacterium*. Prątki *Mycobacterium* można podzielić na wolnorosnące oraz szybko-rosnące. Bakterie z rodzaju *Mycobacterium* charakteryzują się tlenowym metabolizmem oraz pałeczkowatym kształtem. Ich średnica wynosi 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  natomiast długość 2-10  $\mu\text{m}$ . Ponad 60% składu ściany komórkowej prątków stanowią lipidy. Ten specyficzny skład ściany komórkowej zapewnia tym bakteriom wysoką odporność na czynniki zewnętrzne m.in. wysuszenie, wysoką i niską temperaturę oraz pH [Bagieńska i wsp., 2010; Pfyffer, 2007].

Prątki są zdolne do przeżywania wewnątrzkomórkowego, wewnątrz makrofagów – komórek odpornościowych gospodarza. Najprawdopodobniej ta charakterystyczna cecha umożliwia im niezwykle skuteczną infekcję organizmu gospodarza. Wśród rodzaju *Mycobacterium* można wyróżnić gatunki chorobotwórcze jak i saprofityczne. Istnieje coraz więcej doniesień o możliwości zakażenia przez prątki saprofityczne np. u osób z upośledzoną odpornością – są to tzw. zakażenia oportunistyczne [Gangadharam i wsp., 1998]. Ze względu na rodzaj choroby, którą mogą wywołać prątki można podzielić je na dwie grupy: *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) - prątki wywołujące klasyczną postać gruźlicy oraz prątki niegruźlicze (NTM - *ang. nontuberculous mycobacteria*) - będące przyczyną mykobakterioz.

## 1.2. Epidemiologia bakterii z rodzaju *Mycobacterium*

Według danych WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) szacuje się, że 10,4 miliona ludzi zachorowało na gruźlicę w 2016 roku. Gruźlica jest dziesiątą wiodącą przyczyną śmierci na świecie i wiodącą przyczyną śmierci spowodowaną czynnikiem zakaźnym,

w rankingu przewyższającą HIV/AIDS. Szacuje się, że w 2016 roku z powodu gruźlicy zmarło 1,3 miliona osób HIV-negatywnych oraz 0,37 miliona osób HIV-pozytywnych. Największe wyzwanie stanowią przypadki gruźlicy lekoopornej. W 2016 roku zdiagnozowano 600 000 nowych przypadków gruźlicy odpornej na ryfampicynę (RR-TB), najbardziej skutecznego leku pierwszego rzutu, z czego 490 000 stanowiły przypadki gruźlicy wielolekoopornej (MDR-TB). Te niepokojące statystyki przyczyniły się do zaplanowania przez WHO na lata 2016-2035 strategii „End TB” mającej na celu zakończenie globalnej epidemii gruźlicy [WHO Report, 2018].

Zagrożenie dla zdrowia publicznego stanowią również inni przedstawiciele rodzaju *Mycobacterium*, należący do grupy patogenów oportunistycznych, określane jako prątki NTM lub MOTT (inne niż *Mycobacterium tuberculosis*, ang. *mycobacteria other than tuberculosis*). W ciągu ostatnich dwudziestu lat, na całym świecie wzrasta liczba zakażeń tymi prątkami, a według Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Klatki Piersiowej (ang. *American Thoracic Society*, ATS), częstość występowania zakażeń spowodowanych przez MOTT waha się od 1,0 do 1,8 przypadków na 100000 osób [Hernández – Garduño i Elwood 2010, Gryffit i wsp., 2007]. Najczęściej izolowanymi szczepami MOTT od pacjentów na całym świecie są: *Mycobacterium avium complex* (47% wszystkich przypadków), *Mycobacterium gordonae* (11%), *Mycobacterium xenopi* (8%), *Mycobacterium fortuitum complex* (7%), *Mycobacterium kansasii* (4%) i *Mycobacterium abscessus* (3%) [Antczak i wsp., 2017; Hoefsloot i wsp., 2013].

Pomimo ogromnego postępu w leczeniu gruźlicy poczynionego w ciągu ostatnich 50 lat, stanowi ona nadal jeden z najpoważniejszych problemów współczesnego świata, niezbędnym jest zrozumienie mechanizmów, które odpowiadają za sukces *Mycobacterium tuberculosis* jako wewnątrzkomórkowego patogenu.

### **1.3. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs) u *Mycobacterium***

#### **1.3.1. Wprowadzenie**

Sukces *Mycobacterium tuberculosis* jako patogenu związany jest ze zdolnością adaptacyjną tych bakterii do różnorodnych warunków bytowania w organizmie człowieka na różnych etapach infekcji, dzięki szybkiej i adekwatnej odpowiedzi na sygnały docierające z otoczenia. Aby szybko i efektywnie reagować na zmieniające się warunki środowiskowe, prątki wykorzystują dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs). Zidentyfikowano ponad 4000 TCSs w 145 zsekwencjonowanych genomach bakteryjnych [Ulrich i wsp., 2005]. Pierwszym scharakteryzowanym dwukomponentowym systemem transdukcji sygnału u *M. tuberculosis* był system MtrA-MtrB. U *M. tuberculosis* opisano dotychczas 12 par TCSs (SenX3/RegX3, TcrA/HK1, HK2, PhoP/PhoR, NarS/NarL, PrrA/PrrB, MprA/MprB, KdpD/KdpE, TrcR/TrcS, DosS-DosT/DosR, MtrA/MtrB, TcrY/TcrX, PdtA/PdtR). Oprócz zidentyfikowanych, klasycznych dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału, genom *M. tuberculosis* posiada również informacje o tzw. „sierocych” elementach TCSs, dla których białka partnerskie są wciąż poszukiwane [Zhou i wsp., 2015; Zahrt i wsp., 2000; Marszałek i wsp., 2014]. Typowy TCSs jest zbudowany z dwóch białek: kinazy histydynowej (HK) i regulatora odpowiedzi (RR).

#### **1.3.2. Charakterystyka kinaz histydynowych (HK)**

Histydynowe kinazy nazywane inaczej sensorowymi kinazami, są zazwyczaj białkami błonowymi zbudowanymi z domeny sensorowej (odbierającej sygnał) i domeny transmisyjnej o aktywności kinazy [Wolanin i wsp., 2002]. Za specyfikę systemu odpowiada domena sensorowa, która jest wrażliwa na zmiany środowiska. Histydynowe kinazy reagują na szereg bodźców: stężenie fosforanów, temperaturę, światło, dostępność tlenu, pH, potencjał redoks. Domena o aktywności kinazy jest w dużej mierze konserwatywna i stanowi zarówno miejsce autofosforylacji, jak i interakcji z białkiem regulatorowym. Histydynowe kinazy działają jako dimery, w których jeden monomer katalizuje fosforylację reszty histydynowej w drugim monomerze. C-terminalna domena

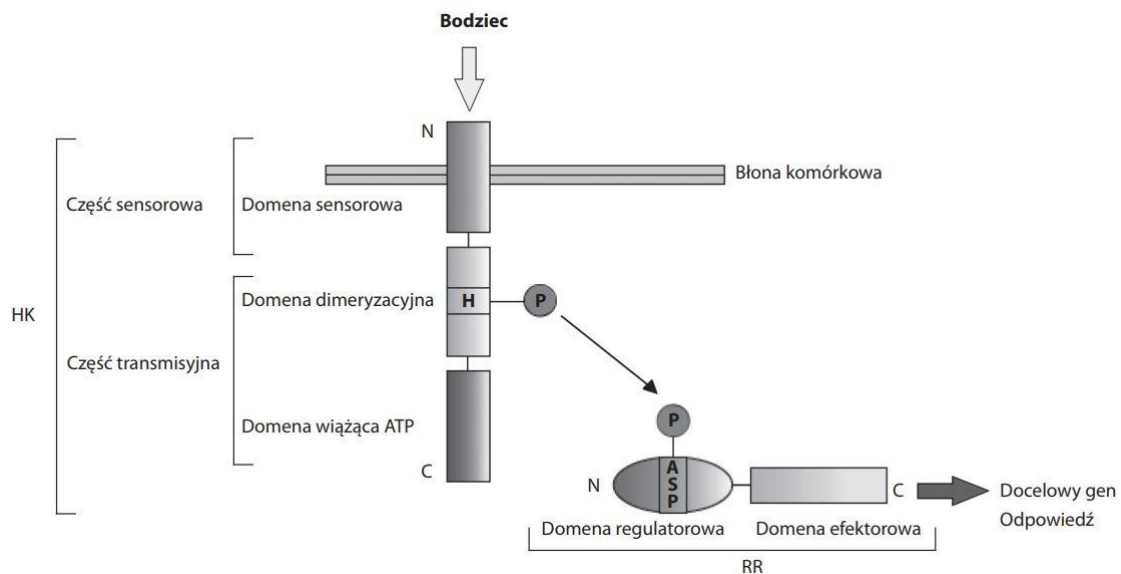
transmisyjna histydynowej kinazy odpowiada za interakcję pomiędzy dwoma monomerami HK oraz interakcję kinazy z regulatorem odpowiedzi RR w ten sposób kontrolując specyfikę interakcji pomiędzy tymi białkami. Niektóre histydynowe kinazy mają także aktywność fosfataz i mogą pośredniczyć zarówno w fosforylacji jak i defosforylacji ich partnerskich regulatorów odpowiedzi [Parish, 2014].

### **1.3.3. Charakterystyka regulatorów odpowiedzi (RR)**

Regulatory odpowiedzi są cytoplazmatycznymi białkami partnerskimi sensorowych kinaz, odpowiedzialnymi za otrzymywanie sygnału w postaci reszty fosforanowej, a następnie wywoływanie zmian w ekspresji genów. RR posiadają dwudomenową strukturę. Zawierają domenę regulatorową posiadającą konserwowaną resztę asparaginianową i domenę efektorową, która najczęściej posiada motyw wiążący DNA. Domeny efektorowe są wykorzystywane do grupowania RR na podrodziny w zależności od domeny wiążącej DNA. Regulatory odpowiedzi są zwykle fosforylowane przez ich partnerskie kinazy histydynowe, choć niektóre z nich mogą również aktywnie katalizować fosfotransfer *in vitro* [Jung i wsp., 2012].

### **1.3.4. Mechanizm działania TCSs**

Podsumowując, TCSs wykrywają bodźce środowiskowe (m.in. jony, temperaturę, pH, ciśnienie tlenu, potencjał redoks oraz kontakt z komórkami gospodarza) przez autofosforylację konserwatywnej reszty histydynowej białka sensorowego. Białko sensorowe przenosi następnie grupę fosforanową na resztę kwasu asparaginowego regulatora transkrypcji. Aktywowane białka regulatorowe indukują zmiany w ekspresji genów, co wpływa na takie procesy jak: wirulencja, koniugacja, tworzenie biofilmów, regulacja licznych szlaków metabolicznych, transport jonów i substancji odżywczych, ruchliwość i inne procesy komórkowe (**Rycina 1.1.**) [Haydel i wsp., 2004].



**Rycina 1.1.** Schemat działania dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału u bakterii [Zmodyfikowano z: West i Stock, 2001].

Uważa się, że dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału odgrywają szczególnie ważną rolę w zdolności bakterii do wirulencji. Osłabienie wirulencji zaobserwowano po inaktywacji genów regulatorowych TCSs w komórkach *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*. Ponadto istnieją doniesienia, że brak funkcjonalnego regulatora odpowiedzi DevR skutkuje atenuacją prątków gruźlicy. Funkcjonalna analiza genów *mprAB* oraz *senX3-regX3* *M. tuberculosis* wykazała, że geny te są niezbędne dla wirulencji. Związek pomiędzy TCSs a opornością wielolekową u *M. tuberculosis* nie został jednak jak do tej pory zbadany [Zhou i wsp., 2015].

### 1.3.5. Charakterystyka TCS u mykobakterii

System SenX3-RegX3 (Rv0490/Rv0491) był jednym z pierwszych zidentyfikowanych mykobakteryjnych TCSs. SenX3 pełni rolę sensorowej kinazy fosforylującej regulator odpowiedzi RegX3. System ten odgrywa istotną rolę w wirulencji *M. tuberculosis* [Rifat i wsp., 2014]. U *Mycobacterium smegmatis* wykazano, że SenX3-RegX3 kontroluje ekspresję genów odpowiedzialnych za pozyskiwanie fosforanów. System ten jest niezbędny dla optymalnego wzrostu bakterii w warunkach deficytu fosforanów.

Jest również niezbędny do przeżycia prątków, w komórkach ludzkiej linii komórkowej monocytarno-makrofagowej THP-1, aktywowanych mysich makrofagach oraz płucach ssaków [James i wsp., 2012].

TcrA/HK1, HK2 (Rv0602c/ Rv0600c, Rv0601c) to trójskładnikowy system transdukcji sygnału. Dwie kinazy histydynowe, HK1 i HK2, same w sobie są нефункционаłne, ale wzajemnie się uzupełniają, przez co są w stanie fosforylować regulator odpowiedzi TcrA. Obecnie niewiele wiadomo o funkcji tego systemu transdukcji sygnału. Istnieją jedynie doniesienia, że gen *rv0601c* jest regulowany negatywnie w warunkach niedoboru tlenu [Shrivastava i wsp., 2009].

System PhoP/PhoR (Rv0757/Rv0758) jest jednym z najlepiej zbadanych mykobakteryjnych dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału. Wykazano, że system ten odgrywa kluczową rolę w wirulencji prątków. Komórki zmutowanego szczepu pozbawionego funkcjonalnych genów Rv0757, Rv0758 cechują się istotnie odmienną morfologią kolonii w porównaniu do komórek szczepu „dzikiego”. Ten TCSs odgrywa również istotną rolę w procesie syntezy lipidów u prątków [Gonzalo i wsp., 2006].

Geny *rv0844c/rv0845* *M. tuberculosis* kodują regulator odpowiedzi NarL i kinazę histydynową NarS. Ten dwuskładnikowy system zaangażowany jest w regulację metabolizmu związków azotu [Malhotra i wsp., 2015]. Istnieją doniesienia o wzajemnym oddziaływaniu białka NarL z innym systemem transdukcji sygnału DosS-DosT/DosR.

System PrrAB (Rv0903c/Rv0902c) składa się z regulatora odpowiedzi PrrA i sensorowej kinazy. Białko PrrA jest członkiem rodziny OmpR i zawiera charakterystyczną domenę wiążącą DNA (*ang. winged helix-turn-helix*, uskrzydłona helisa-pętla-helisa) [Nowak i wsp., 2006]. System ten jest jednym z czterech konserwatywnych systemów dwuskładnikowych we wszystkich gatunkach prątków, co podkreśla jego fundamentalne znaczenie dla tych bakterii. Geny *prpA* i *prpB* ulegają ekspresji podczas wewnątrzkomórkowego wzrostu w ludzkich makrofagach, są również niezbędne we wczesnej fazie wewnątrzkomórkowego namnażania prątków w mysich makrofagach. Dane te sugerują, że system ten odgrywa istotną rolę w rozwoju infekcji [Haydel i wsp., 2012].

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału MprA/MprB (Rv0981/Rv0982) składa się z sensorowej kinazy MprB oraz białka regulatorowego MprA. Regulator odpowiedzi MprA reguluje ekspresję genów kodujących czynniki sigma SigB oraz SigE. Dowiedziono, że system ten pełni istotną rolę w odpowiedzi prątków na czynniki stresowe dotyczące w szczególności otoczki komórkowej [Bretl i wsp., 2012]. MprAB odgrywa również istotną rolę podczas zakażenia *M. tuberculosis*. Wykazano, że zdolność do syntezy białka MprA przez prątki jest niezbędna do wywołania infekcji u myszy [Zahrt i wsp., 2001].

W systemie KdpD/KdpE (Rv1028c/Rv1027c) białko KdpD pełni rolę sensorowej kinazy, natomiast białko KdpE regulatora odpowiedzi. Ten TCSs odgrywa istotną rolę w regulacji transportu jonów potasu ( $K^+$ ). Jony  $K^+$  pełnią ważną rolę w zjadliwości drobnoustrojów [Singh i wsp., 2006]. Badania wykazały, że delekcja genów systemu *kdpDE* powoduje wzrost wirulencji prątków u myszy z obniżoną odpornością. System dwuskładnikowy KdpD/KdpE został zidentyfikowany zatem jako regulator wirulencji odpowiedzialny za wewnątrzkomórkowe przeżycie prątków [Freeman i wsp., 2013].

System TrcR/TrcS (Rv1033c/Rv1032c) składa się z sensorowej kinazy TrcS oraz białka regulatorowego TrcR. Bodźce indukujące autofosforylację TrcS nadal pozostają nieznane. Wykazano, że ekspresja genów *trcR* oraz *trcS* następuje podczas wzrostu bakterii w warunkach hodowli tlenowej oraz na niskim poziomie we wczesnych etapach infekcji. Ekspresji genów *trcR* oraz *trcS* nie obserwuje się jednak w późniejszych stadiach zakażenia [Haydel i wsp., 2002]. Inne badania wykazały natomiast, że mutanty z niefunkcyjnym genem *trcS* były w pełni wirulentne zarówno w mysich makrofagach, jak i u zakażonych myszy podczas ostrej fazy infekcji. Sugeruje to, że system TrcR/TrcS nie jest zaangażowany w adaptację prątków do środowiska wewnątrzkomórkowego ani w patogenezę [Ewann i wsp., 2002].

Trójskładnikowy system transdukcji sygnału DosS-DosT/DosR, (Rv3132c-Rv2027c/Rv3133) składa się z dwóch kinaz histydynowych DosS i DosT oraz białka regulatorowego DosR. Interakcja pomiędzy białkami DosS/DosR reguluje wejście komórek *M. tuberculosis* w fazę latentną. DosT, natomiast za pośrednictwem DosR, uczestniczy w kontrolowaniu stanu spoczynku (*ang. dormancy*) [Sivaramakrishnan i wsp., 2013]. Białko DosT reaguje na

bodźce środowiskowe jakimi są brak tlenu, stężenie tlenu azotu lub tlenu węgla [Sousa i wsp., 2007].

W systemie MtrAB (Rv3246c/Rv3245c) białko MtrB pełni rolę sensorowej kinazy przekazującej resztę fosforanową na regulator odpowiedzi MtrA. Wykazano, że białko MtrA jest niezbędne do wzrostu komórek *M. tuberculosis* [Robertson i wsp., 2007; Rajagopalan i wsp. 2010]. Uważa się, że TCSs MtrAB uczestniczy w regulacji syntezy ściany komórkowej, podziale komórkowym oraz ma wpływ na morfologię komórek mykobakterii [Nguyen i wsp., 2010; Plocinska i wsp., 2012; Plocinska i wsp., 2014; Gorla i wsp., 2018].

W skład systemu TcrY/TcrX, (Rv3764c/ Rv3765c) wchodzi sensorowa kinaza TcrY i regulator odpowiedzi TcrX. Dotychczas, niewiele wiadomo na temat funkcji tego układu. Badania, przeprowadzone na myszach z upośledzoną odpornością, wykazały, że brak funkcjonalnych białek TcrY/TcrX skutkuje zwiększeniem zjadliwości szczepu [Bhattacharya i wsp., 2011].

## **1.4. Niekanoniczne systemy transdukcji sygnału u mykobakterii**

### **1.4.1. Sieroce kinazy i białka regulatorowe**

Oprócz 12 opisanych dotychczas dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału, w proteomie mykobakterii znajdują się białka, dla których funkcjonalni partnerzy nie zostali dotychczas opisani. Białka te wykazują bliskie pokrewieństwo filogenetyczne do innych białek należących do TCSs i zostały nazwane tzw. „sierocymi” białkami. W przypadku genów kodujących białka „sieroce”, nie występują one w operonie wraz z genami kodującymi ich białka partnerskie [Bretl i wsp., 2011]. Do „sierocych” białek TCSs *M. tuberculosis* należą potencjalne regulatory odpowiedzi : Rv0195, Rv0260c, Rv0818, Rv2884 oraz Rv3143.

Białko Rv0195 należy do rodziny LuxR. W warunkach beztlenowych brak funkcjonalnego białka Rv0195 skutkuje zmianą ekspresji około 180 genów regulowanych niezależnie od DosR. Delecja genu *rv0195* wpływa znacząco na zmniejszenie przeżywalności komórek prątków w warunkach hipoksji oraz stresu oksydacyjnego. Dane



literaturowe wskazują również na potencjalną rolę białka w przystosowywaniu się bakterii do stanu spoczynku, ponownym przejściu do stanu aktywnego oraz w wirulencji [Fang i wsp., 2013].

Białko Rv0260c posiada motyw regulatora transkrypcji charakterystyczny dla regulatora odpowiedzi. Białko to posiada homologię do białka HemD, które odpowiada za syntezę uroporfirynogenu. Ponadto gen *rv0260* znajduje się w pobliżu genu kodującego białko CbiX, które bierze udział w biosyntezie kobalaminy. Gen kodujący białko Rv0260c podlega indukcji podczas głodu azotowego jednak jego dokładna funkcja nie jest obecnie znana [Williams i wsp., 2015].

Badania dotyczące białka Rv0818 (GlnR) wykazały, iż pełni ono istotną funkcję w regulacji ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm azotu [Malm i wsp., 2009]. U prątków gruźlicy białko to jest niezbędne w procesie infekcji warunkując wewnątrzkomórkowe przeżycie prątków. Wpływa ono bowiem na regulację genów odpowiedzialnych za m.in. metabolizm azotanów i azotynów jak również ornityny i asparaginy [Jenkins i wsp., 2013].

Białko Rv2884, homolog białka GlnR (Rv0818) jest prawdopodobnie regulatorem transkrypcji. Funkcja tego białka nie jest dotychczas poznana. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy dla regulonu SigF wykazały, że gen *rv2884* jest najsilniej indukowany przez ten czynnik transkrypcyjny. Wskazuje to na istnienie zależności pomiędzy szlakami metabolicznymi u *M. tuberculosis*, w których jeden regulator (SigF) reguluje ekspresję drugiego (GlnR) [Hartkoorn i wsp., 2012].

Niewiele wiadomo o białku regulatorowym Rv3143. Nadprodukcję białka Rv3143 obserwowano u wysoce wirulentnych szczepów prątków gruźlicy z rodziny Beijing, co może wskazywać na potencjalną rolę białka Rv3143 w kształtowaniu zjadliwości szczepów *M. tuberculosis* [Rose i wsp., 2013].

#### **1.4.2. Białka regulatorowe bez domeny wiążącej DNA**

Regulatory odpowiedzi można podzielić na co najmniej trzy klasy, w oparciu o cechy domen efektorowych: regulatory z domeną efektorową wiążącą DNA, regulatory

z enzymatyczną domeną efektorową i jednodomenowe regulatory odpowiedzi. Wyróżniamy także regulatory odpowiedzi z innymi typami domen efektorowych, w tym domeny efektorowe wiążące RNA.

Regulatory odpowiedzi z domeną efektorową wiążącą DNA występują najczęściej u bakterii. Wykazują one bezpośredni wpływ na transkrypcję.

Kolejną klasą regulatorów odpowiedzi są RR z enzymatycznymi domenami efektorowymi. Te regulatory odpowiedzi mogą uczestniczyć w transdukcji sygnału i generować wtórne cząsteczki przekaźnikowe [Galperin, 2010].

Stosunkowo niewielka liczba regulatorów odpowiedzi, to jednodomenowe białka. Zawierają one jedynie domenę regulatorową. Mechanizm działania tej klasy RR opiera się na interakcji białko-białko. Domena regulatorowa ulega zmianie konformacyjnej, ponieważ wchodzi w interakcję z autofosforylowaną kinazą histydynową i w konsekwencji regulator odpowiedzi może inicjować dalsze reakcje wzdłuż kaskady sygnalizacyjnej [Sarkar i wsp., 2010].

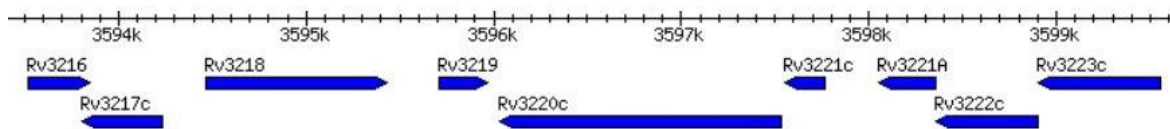
Ze wszystkich domen wiążących RNA opisanych w literaturze w ciągu ostatnich kilku lat, tylko jedna ANTA jest powszechnie spotykana w regulatorach odpowiedzi. W regulatorach transkrypcji typu AmiR i NasT ta domena inicjuje transkrypcję przez zapobieganie terminacji transkrypcji przez terminatory Rho - niezależne. Domena wiążąca RNA - ANTA występuje w białku PdaR (Rv1626), będącym partnerem kinazy histydynowej PdaS [Galperin, 2006].

#### **1.4.3. Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdaS/PdaR**

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdaS/PdaR jest przykładem systemu z białkiem regulatorowym bez domeny wiążącej DNA.

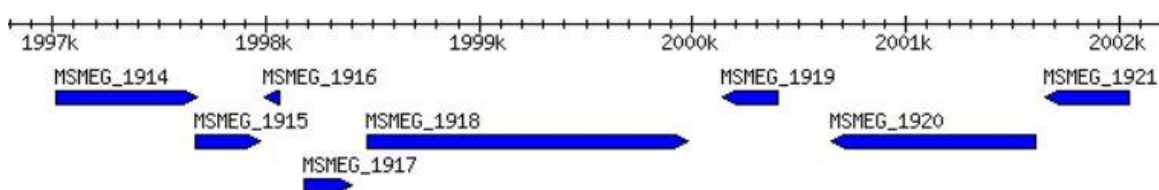
Gen *rv3220c* koduje kinazę histydynową PdaS *M. tuberculosis*. Gen ten posiada 1506 pz i umiejscowiony jest w pozycji 3596029 na chromosomie. Białko posiada masę cząsteczkową 54012.5 Da, punkt izoelektryczny równy 5.5788 i składa się z 501 aminokwasów. Homologami białka PdaS *M. tuberculosis* są białka: Mb3246c (*M. bovis*), ML0803 (*M. leprae*), MMAR\_1337 (*M. marinum*) oraz MSMEG\_1918 (*M. smegmatis*).

W bezpośrednim otoczeniu genu *rv3220c* znajdują się m.in. geny kodujące: regulator transkrypcji (*whiB1* - *rv3219*), konserwatywne białko membranowe (*rv3217c*), białko zaangażowane w metabolizm lipidów (*TB7.3* - *rv3221c*), czynnik anty-sigma (*pshA* - *rv3221A*) oraz geny o dotychczas nieznannej funkcji (*rv3218*, *rv3222c*), (**Rycina 1.2.**).



**Rycina 1.2.** Schemat przedstawiający lokalizację genu *rv3220c* w genomie *M. tuberculosis* [z bazy TB Database].

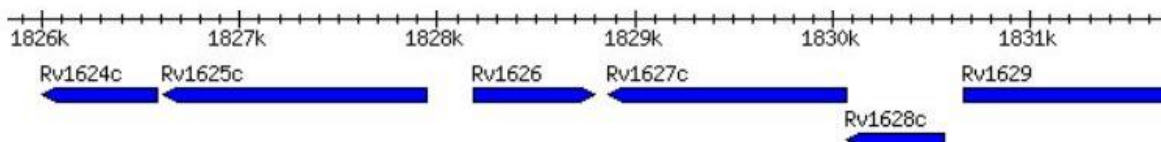
Gen *msmeg\_1918* koduje kinazę histydynową PdaS *M. smegmatis*. Gen ten posiada 1500 pz i umiejscowiony jest w pozycji 1998476 chromosomu. Białko posiada masę cząsteczkową 53695.1 Da, punkt izoelektryczny równy 5.7293 oraz składa się z 499 aminokwasów. W bezpośrednim otoczeniu genu *msmeg\_1918* znajdują się m.in. geny kodujące: regulator transkrypcji (*whiB* – *msmeg\_1919*), kinazę diacyloglicerolową (*msmeg\_1920*), czynnik anty-sigma (*msmeg\_1915*), polimerazę RNA zawierającą czynnik sigma 70 (*msmeg\_1914*), oraz geny o dotychczas nieznannej funkcji (*msmeg\_1917*, *msmeg\_1916*), (**Rycina 1.3.**).



**Rycina 1.3.** Schemat przedstawiający lokalizację genu *msmeg\_1918* w genomie *M. smegmatis* [z bazy TB Database].

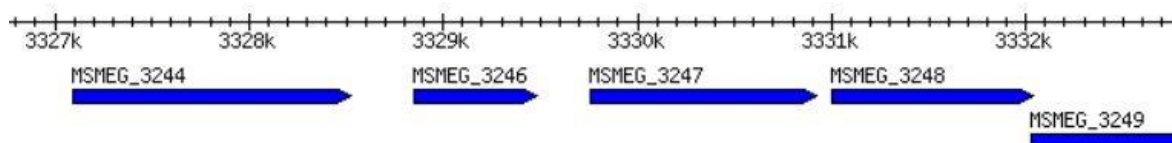
Gen *rv1626* koduje regulator odpowiedzi PdaR *M. tuberculosis*. Gen ten posiada 618 pz i umiejscowiony jest w pozycji 1828180 chromosomu. Białko posiada masę cząsteczkową 22669.2 Da, punkt izoelektryczny równy 4.7423 i składa się z 205 aminokwasów. Homologami białka PdaR *M. tuberculosis* są białka: Mb1652 (*M. bovis*),

ML1286 (*M. leprae*), MSMEG\_3246 (*M. smegmatis*). W bezpośrednim otoczeniu genu *rv1626c* znajdują się m.in. geny kodujące: zakotwiczoną w błonie cyklazę adenylilową (*rv1625c*), konserwatywne białko membranowe (*rv1624c*), podjednostkę I oksydazy ubiquinolu cytochromu D (*cydA* - *rv1623c*), niespecyficzne białko transportujące lipidy (*rv1627c*), DNA polimerazę pierwszą (*polA* - *rv1629*) oraz gen o dotychczas nieznaną funkcję (*rv1628c*), (**Rycina 1.4.**).



**Rycina 1.4.** Schemat przedstawiający lokalizację genu *rv1626* w genomie *M. tuberculosis* [z bazy TB Database].

Gen *msmeg\_3246* koduje regulator odpowiedzi PdaR *M. smegmatis*. Gen ten posiada 627 pz i umiejscowiony jest w pozycji 3328852 chromosomu. Białko posiada masę cząsteczkową 23173.5 Da, punkt izoelektryczny równy 4.6277 oraz składa się z 208 aminokwasów. W bezpośrednim otoczeniu *msmeg\_3246* znajdują się m.in. geny kodujące: białko wiążące DNA indukowane głodzeniem (*msmeg\_3242*), transportery ABC uczestniczące w transporcie aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach (*msmeg\_3247*, *msmeg\_3248*, *msmeg\_3249*) oraz geny o dotychczas nieznaną funkcję (*msmeg\_3244*, *msmeg\_3241*), (**Rycina 1.5.**).



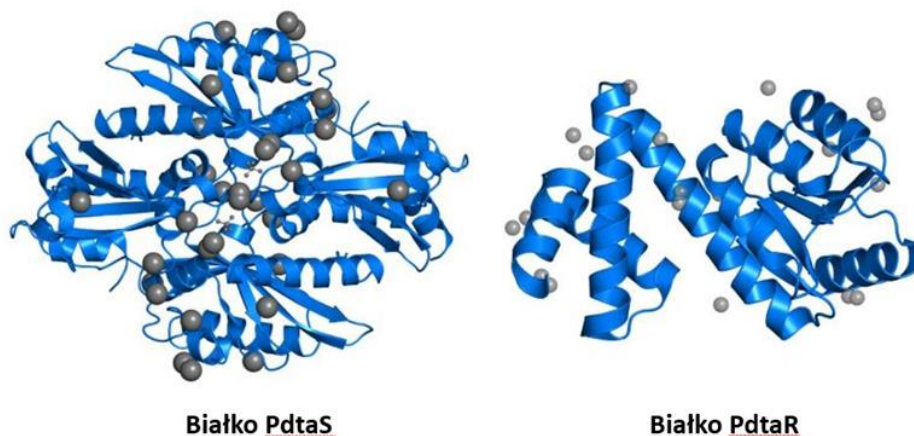
**Rycina 1.5.** Schemat przedstawiający lokalizację genu *msmeg\_3246* w genomie *M. smegmatis* [z bazy TB Database].

Białko PdtaS (**Rycina 1.6.**) jest zbudowane z domen białkowych charakterystycznych dla histydynowych kinaz jak również domeny PAS, która również odpowiedzialna jest za odbiór sygnału ze środowiska. Białko PdtaS jest zdolne do autofosforylacji w obecności  $Mg^{2+}/ATP$ , a następnie przenoszenia grupy fosforylowej do regulatora odpowiedzi PdtaR. Zarówno białko PdtaS jak i PdtaR są konserwatywne dla wszystkich gatunków mykobakterii i wykazują silną ekspresję po 18 godzinach wewnątrzkomórkowego wzrostu, która obniża się po 110 godzinach, co sugeruje, że białka te są ważne we wczesnych etapach infekcji *M. tuberculosis* [Ghosh i wsp., 2013]. Ponadto białko Rv1626 nie jest białkiem niezbędnym dla przeżycia prątków, a tym samym możliwe jest jego usunięcie z komórki.

Na podstawie badań krystalograficznych wykazano, że PdtaR działa na poziomie antyterminacji transkrypcji. Zaobserwowano także, że Rv1626 wykazuje wysokie podobieństwo strukturalne do znanego czynnika antyterminacji transkrypcji, białka AmiR z *Pseudomonas aeruginos* zawierającego domenę ANRAR (domena wiążąca RNA - regulator antyterminacji transkrypcji). Autorzy zwrócili również uwagę na występujący w sąsiedztwie genu *pdtaR* gen kodujący tRNA<sup>Leu</sup>, co jest szczególnie istotne ze względu na to, że tRNA odgrywa kluczową rolę w antyterminacji, jak również może posiadać aktywność antyterminacyjną względem samego siebie [Morth i wsp., 2005].

Parish i współpracownicy skonstruowali rekombinowane szczepy *M. tuberculosis* defektywne w syntezie funkcjonalnego białka PdtaS i badali ich wirulencję na modelu mysim z upośledzonym systemem odpornościowym (SCID- severe combined immunodeficiency). Myszy zakażone prątkami ze zmutowanym genem (delecja *rv3220c*) nie wykazywały istotnych zmian w przeżywalności, w porównaniu do zwierząt infekowanych szczepem typu dzikiego [Parish i wsp., 2003].

Białko PdtaR (**Rycina 1.6.**) jest obecnie badane pod kątem możliwości wykorzystania go w charakterze antygeny w szczepionkach przeciwgruźliczych nowej generacji. Badania przeprowadzone na myszach C57BL/6 szczepionych białkiem PdtaR podawanym wraz z adiuwantem DDA wykazały istotne działanie immunogenne w odpowiedzi swoistej na podany antygen [Rubio-Reyes i wsp., 2017].



**Rycina 1.6.** Modele struktur białek PdtaS oraz PdtaR *Mycobacterium tuberculosis* [z bazy Protein Data Bank in Europe].

## 1.5. Lekooporność gruźlicy

### 1.5.1. Wprowadzenie

Gruźlica lekooporna jest śmiertelną chorobą zakaźną, która stanowi globalne zagrożenie. Wpływa nie tylko na pacjentów i ich rodziny, ale także stanowi ogromne obciążenie dla całego sektora zdrowia publicznego, któremu wkrótce może zacząć brakować zasobów potrzebnych do powstrzymania tej choroby [Jagielski i wsp., 2010a].

Szczepy gruźlicy lekoopornej możemy podzielić na 4 kategorie, dla których istotnie różni się wskaźnik skuteczności leczenia:

1. Gruźlica oporna na jeden lek np. gruźlica oporna na ryfampicynę (*ang. rifampicin resistant* - RR),
2. Gruźlica wielolekooporna (*ang. multidrug-resistant* – MDR) definiowana jako gruźlica, w której prątki odporne są na co najmniej izoniazyd i ryfampicynę (kluczowe leki w terapii gruźlicy),
3. Gruźlica wielolekooporna o rozszerzonej lekooporności (*ang. extensively drug-resistant* – XDR) definiowana jako podgrupa MDR-TB z dodatkową opornością na fluorochinolony (co najmniej jeden) i leki podawane w zastrzykach (co najmniej jeden – np. amikacyna, kanamycyna, kapreomycyna),

4. Gruźlica całkowicie lekooporna (*ang. totally drug resistance – TDR*) czyli gruźlica w której prątki odporne są na leki I wyboru oraz wszystkie lub część leków II wyboru [Jagielski i wsp., 2010b].

### **1.5.2. Epidemiologia gruźlicy lekoopornej**

Szacuje się, że w 2016 roku 490 000 osób zachorowało na gruźlicę wielolekooporną (MDR-TB), a 190 000 zmarło z jej powodu. Do 2015 roku 105 krajów zgłosiło co najmniej jeden przypadek gruźlicy wielolekoopornej o rozszerzonej lekooporności (XDR-TB). Według Światowej Organizacji Zdrowia, ponad połowa przypadków MDR-TB na świecie przypada na trzy kraje: Indie, Chiny i Rosję.

WHO szacuje, że w 2014 roku 41% osób zostało zdiagnozowanych z gruźlicą MDR. Dlatego na kolejne lata, zaplanowano program „END TB” o globalnym zasięgu, mający na celu poprawę alarmujących statystyk dotyczących diagnostyki i leczenia gruźlicy [WHO Report, 2018].

Do priorytetów globalnego programu „END TB” należą:

- Zapobieganie rozprzestrzeniania się lekooporności przez zachowanie wysokich standardów leczenia gruźlicy wrażliwej na farmaceutyki.
- Rozszerzona, szybka diagnostyka (testy molekularne) i wykrywanie lekoopornych przypadków gruźlicy.
- Zapewnienie natychmiastowego dostępu do efektywnej terapii i właściwej opieki nad pacjentem.
- Zapobieganie transmisji patogenu.
- Zwiększenie finansowania w zakresie diagnostyki i leczenia gruźlicy.

## **1.6. Leczenie gruźlicy**

### **1.6.1. Leki przeciwgruźlicze**

Leki przeciwgruźlicze dzielą się na pięć grup. Grupa pierwsza to tzw. leki pierwszego wyboru, o największej skuteczności. Leki należące do grup od drugiej do piątej

to leki drugiego i trzeciego wyboru cechujące się mniejszą skutecznością i wyższą toksycznością, niż te z grupy pierwszej. W **Tabeli 1.1.** przedstawiono klasyfikację leków przeciwprątkowych wraz z przykładami.

**Tabela 1.1.** Klasyfikacja leków przeciwprątkowych [Jagielski, 2017].

	<b>Grupa</b>	<b>Opis</b>	<b>Przykłady</b>
<b>Leki pierwszego wyboru</b>	I	Leki doustne I rzutu	Isoniazyd (INH) Ryfampicyna (RMP) Pirazynamid (PZA) Etambutol (EMB)
<b>Leki drugiego wyboru</b>	II	Parenteralne leki przeciwprątkowe (PLP)	Streptomycyna (SM) Kanamycyna (Km) Amikacyna (Am) Kapreomycyna (Cm)
<b>Leki drugiego wyboru</b>	III	Fluorochinolony (FQ)	Ofloksacyna (Ofx) Lewofloksacyna (Lfx) Moksyfloksacyna (Mfx) Gatyfloksacyna (Gfx)
<b>Leki drugiego wyboru</b>	IV	Leki doustne II rzutu	Etionamid (Eto) Protionamid (Pto) Cykloseryna (Cs) Teryzydron (Trd) Kwas p-aminosalicylowy (PAS)
<b>Leki Trzeciego wyboru</b>	V	Leki o niepotwierdzonej skuteczności	Klofazymina (Cfz) Klarytromycyna (Clr) Linezolid (Lzd) Tioacetazon (Thz)

### 1.6.2. Leczenie gruźlicy

W leczeniu gruźlicy lekowrażliwej stosuje się standardowo 6-miesięczny okres leczenia, który dzieli się na dwie fazy. Faza intensywna trwa dwa miesiące, podczas których choremu podawane są cztery podstawowe leki przeciwprątkowe (izoniazyd, ryfampicynę, pirazynamid, etambutol). Następnie leczenie wchodzi w fazę podtrzymującą podczas której podawane są dwa leki (izoniazyd, ryfampicyna). Dwufazowość leczenia ma na celu eliminację prątków o różnej aktywności metabolicznej [Ahuja i wsp., 2012].



**Tabela 1.2.** Schemat leczenia w przypadku gruźlicy lekoopornej.

Oporność prątków	Stosowane leki	Minimalny czas leczenia [miesiące]
Brak	Izoniazyd + ryfampicyna + pirazynamid + etambutol lub streptomycyna	6
Izoniazyd ± streptomycyna	Ryfampicyna + pirazynamid + etambutol + fluorochinolony (opcjonalnie)	6-9
Izoniazyd + pirazynamid	Ryfampicyna + etambutol + fluorochinolony	9-12
Izoniazyd + etambutol	Ryfampicyna + pirazynamid + fluorochinolony	9-12
Ryfampicyna	Izoniazyd + pirazynamid + etambutol + fluorochinolony + parenteralne leki przeciwprątkowe (opcjonalnie)	12-18
Ryfampicyna + etambutol ± streptomycyna	Izoniazyd + pirazynamid + fluorochinolony + parenteralne leki przeciwprątkowe	18
Ryfampicyna + pirazynamid ± streptomycyna	Izoniazyd + etambutol + fluorochinolony + parenteralne leki przeciwprątkowe	18
Izoniazyd + etambutol + pirazynamid ± streptomycyna	Ryfampicyna + fluorochinolony + leki doustne II rzutu + parenteralne leki przeciwprątkowe	18
Izoniazyd + ryfampicyna	Pirazynamid + fluorochinolony + parenteralne leki przeciwprątkowe + etionamid lub protionamid + cykloseryna lub kwas p-aminosalicylowy	20-26

Leczenie przypadków gruźlicy lekoopornej wymaga precyzyjnego doboru stosowanych leków (**Tabela 1.2**). Terapia wymaga często stosowania leków drugiego rzutu, a te obarczone są gorszą skutecznością i wyższą toksycznością. Leczenie tej jednostki chorobowej jest zdecydowanie dłuższe, a szanse na wyleczenia mniejsze niż w przypadku gruźlicy lekowrażliwej. Dla przykładu odsetek wyleczeń w przypadku gruźlicy lekowrażliwej wynosi - 80%, wielolekoopornej (MDR) – 30%, natomiast wielolekoopornej o rozszerzonej lekooporności (XDR) - 19% [Van Der Werf i wsp., 2014].

Na skuteczność leczenia ma wpływ: właściwy dobór leków i ich dawkowanie, odpowiednio długi czas przyjmowania terapeutyków jak również okresowe monitorowanie skuteczności leczenia.

## 1.7. Antybiotyki aminoglikozydowe w leczeniu gruźlicy

Antybiotyki aminoglikozydowe, w leczeniu gruźlicy, należą do leków drugiego rzutu podawanych pozajelitowo (parenteralnie). Wykazują one działanie bakteriobójcze w głównej mierze na pozakomórkowe populacje prątków. Aminoglikozydami wykorzystywanymi w leczeniu gruźlicy i mykobakterioz są:

- Streptomycyna – pierwszy lek przeciwprątkowy, otrzymywana z wykorzystaniem szczepu *Streptomyces griseus*,
- Kanamycyna - otrzymywana z wykorzystaniem szczepu *Streptomyces kanamyceticus*,
- Amikacyna – syntetyczna pochodna kanamycyny [Jagielski T i wsp., 2014].

Mechanizm działania antybiotyków aminoglikozydowych opiera się na zahamowaniu syntezy białek bakteryjnych poprzez wiązanie się do małej podjednostki rybosomu (30S) – białek oraz cząsteczki 16S rRNA wchodzących w jej skład [Konopska i wsp., 2007]. Oporność prątków na antybiotyki aminoglikozydowe jest najczęściej spowodowana zmianami w strukturze rybosomu. Mutacje w genie *rrs* kodującym 16S rRNA mogą skutkować nabyciem zwiększonej oporności prątków na streptomycynę, amikacynę lub kanamycynę. Natomiast mutacja w genie *rpsL* kodującym białko S12 wchodzącym w skład małej jednostki rybosomu może powodować zwiększoną oporność mykobakterii na streptomycynę [Jagielski, 2017].

Inna strategia nabywania przez prątki oporności na antybiotyki aminoglikozydowe opiera się na inaktywacji leków poprzez modyfikacje chemiczne z wykorzystaniem acetylotransferazy aminoglikozydowej Eis.

## 1.8. Mechanizmy lekooporności prątków

### 1.8.1. Wprowadzenie

Podstawowym mechanizmem, powodującym nabywanie lekooporności przez prątki gruźlicy, jest występowanie mutacji w genach kodujących: cele dla leków lub enzymy aktywujące leki (**Tabela 1.3.**). Mutacje te obejmują: polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang. Single Nucleotide Polymorphism* - SNP), insercje lub delecje. W przeciwieństwie do innych bakterii oporność nie jest uzyskiwana za pomocą horyzontalnego transferu genów warunkowanego przez ruchome elementy genetyczne [Gillespie, 2002].

Lekooporność gruźlicy można podzielić na dwa typy:

1. Lekooporność pierwotna – występuje naturalnie u wszystkich lub prawie wszystkich przedstawicieli gatunku. Przykładem jest wysoka oporność prątków gruźlicy na większość antybiotyków  $\beta$ -laktamowych.
2. Lekooporność wtórna – prątki nabierają oporności na lek lub leki poprzez mutacje [Palomino i wsp., 2014] - to właśnie ta kategoria lekooporności jest kluczowa dla powstawania szczepów wielolekoopornych.

Prątki nabywają oporność na leki przez spontaniczne mutacje z szacowanym prawdopodobieństwem:

- 1 bakteria na  $10^8$  prątków dla ryfampicyny.
- 1 bakteria na  $10^6$  prątków dla izoniazydu, streptomycyny i etambutolu [Dookie i wsp., 2018].

Ostatnie badania wskazują jednak, że częstość mutacji powodujących oporność na leki zmienia się w zależności od linii, do której należy szczep. Przykładem na to jest linia prątków gruźlicy Beijing, która wykazuje zwiększone wskaźniki mutacji w warunkach *in vitro* [Merker i wsp., 2013].

**Tabela 1.3.** Geny zaangażowane w nabywanie oporności na leki u *M. tuberculosis* [Nguyen, 2016].

<b>Antybiotyk</b>	<b>Geny</b>
<b>Izoniazyd</b>	<i>katG</i> (katalaza-peroksydaza) <i>inhA</i> (reduktaza enoilo-ACP) <i>ndh</i> (dehydrogenaza NADH) <i>ahpC</i> (reduktaza wodoronadtlenków alkilowych)
<b>Ryfampicyna</b>	<i>rpoB</i> (podjednostka $\beta$ polimerazy RNA)
<b>Pirazynamid</b>	<i>pncA</i> (pirazynamidaza) <i>rspA</i> (białko rybosomalne S1)
<b>Etambutol</b>	<i>embCAB</i> (arabinozylotransferazy) <i>embR</i> (regulator transkrypcji <i>embCAB</i> )
<b>Streptomycyna</b>	<i>rpsL</i> (białko rybosomalne S12) <i>rrs</i> (16S rRNA) <i>gidB</i> (metylotransferaza 16S rRNA)
<b>Amikacyna/kanamycyna</b>	<i>rrs</i> (16S rRNA) <i>eis</i> (acetylotransferaza aminoglikozydowa)
<b>Kapreomycyna</b>	<i>tlyA</i> (2'-O-metylotransferaza rRNA) <i>rrs</i> (16S rRNA)
<b>Ktionamid</b>	<i>ethA</i> (monooksygenaza flawoproteinowa) <i>ethR</i> (represor transkrypcji <i>ethA</i> ) <i>inhA</i> (reduktaza enoilo-ACP) <i>ndh</i> (dehydrogenaza NADH)
<b>Cykloseryna</b>	<i>alrA</i> (racemaza alaninowa) <i>cycA</i> (białko symportowe D-seryny) <i>ddl</i> (ligaza D-alanylo-D-alaninowa)
<b>Fluorochinolony</b>	<i>gyrA</i> (podjednostka $\alpha$ gyrazy DNA) <i>gyrB</i> (podjednostka $\beta$ gyrazy DNA)
<b>Kwas p-aminosalicylowy</b>	<i>thyA</i> (syntaza tymidylanowa) <i>dfrA</i> (reduktaza dihydrofolianowa) <i>folC</i> (syntaza dihydrofolianowa)

Mutacje opornościowe występują niezależnie od siebie, tak więc prawdopodobieństwo powstania zmutowanych komórek prątków opornych na kilka leków jest sumą prawdopodobieństwa wystąpienia tych mutacji niezależnie. Zatem, prawdopodobieństwo wystąpienia spontanicznych mutacji wywołujące zarówno oporność na izoniazyd i ryfampicynę wynosi 1 na  $10^{14}$  [Sharma i wsp., 2006].

Za nabycie przez prątki lekooporności nabytej często odpowiada proces selekcji. W procesie tym zostaje zmieniona proporcja komórek opornych do wrażliwych na dany lek. Powodem narastającej ilości komórek opornych często jest niewłaściwa terapia. Monoterapia, zbyt małe dawki leków lub zła ich jakość czy też przerwanie leczenia w nieodpowiednim momencie, to wszystko sprawia, że leki mogą niedostatecznie hamować wzrost prątków, a co za tym idzie, odporne bakterie zaczną wypierać wrażliwe. W leczeniu gruźlicy stosuje się kombinację różnych terapeutyków, co przy błędnym stosowaniu może prowadzić do wielolekooporności [Mitchison i wsp., 2012; Nguyen, 2016].

Prątki rozwinęły wiele mechanizmów molekularnych, które pozwalają na neutralizację cytotoksyczności większości substancji chemicznych, w tym antybiotyków. Te mechanizmy ograniczają stosowanie istniejących antybiotyków, a także utrudniają rozwój nowych leków. Przyczynia się to do nabywania przez prątki oporności wielolekowej [Morris i wsp., 2005].

### **1.8.2. Przepuszczalność ściany komórkowej**

Ściana komórkowa prątków, ze względu na swoją budowę, cechuje się niską przepuszczalnością. Ta cecha, czyni z niej naturalną, skuteczną barierę dla leków. Znaczenie ściany komórkowej dla oporności prątków potwierdziły wyniki mutagenyzy transpozonowej [Philalay i wsp., 2004]. Insercje w genach biorących udział w biosyntezie mykolanów, takich jak *kasB* lub operon *virS-mymA* (*rv3082* do *rv3089*) doprowadziły do zwiększenia wrażliwości prątków na ryfampicynę, izoniazyd, pirazynamid [Gao i wsp. 2003]. Ponadto, delecja w genie *fbpA* (białko wiążące fibronektynę) powoduje obniżenie poziomu komórkowego mykolanu trechalozy i w konsekwencji zwiększa wrażliwość prątków na wiele antybiotyków [Nguyen i wsp., 2005].

Aby pobierać składniki odżywcze i małe cząsteczki, mykobakterie wykorzystują poryny, które są zakotwiczone w zewnętrznych warstwach ściany komórkowej. Poryny ułatwiają wnikanie antybiotyków przez ścianę komórkową, wpływając tym samym na oporność prątków na leki. Wykazano, że delecja w genach *mspA* lub *mspC* *M. smegmatis*

skutkuje zwiększeniem oporności na antybiotyki hydrofilowe i hydrofobowe, w tym: ryfampicynę, wankomycynę i erytromycynę [Stephan i wsp., 2004].

Podczas gdy ściana komórkowa mykobakterii spowalnia penetrację antybiotyków, wyspecjalizowane mechanizmy pomagają w detoksykacji cząsteczek leku, którym udało się wniknąć do cytoplazmy.

### **1.8.3. Modyfikacja miejsca wiązania leku**

Jedną ze strategii, którą stosują bakterie w celu uniknięcia działania antybiotyków, jest modyfikacja struktury miejsc wiązania antybiotyków. Mechanizm ten jest stosowany przez *M. tuberculosis* do nabywania oporności na antybiotyki peptydowe takie jak: kapreomycyna i wiomycyna, które są powszechnie stosowane w leczeniu gruźlicy MDR. Badania wykazały, że mutacja w genie *tlyA*, kodującym 2'-O-metylotransferazę powoduje zwiększenie oporności komórek szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* na kapreomycynę i wiomycynę. Białko TlyA metyluje zarówno 16S oraz 23S rybosomalne RNA, czyniąc rybosomy podatnymi na wiązanie kapreomycyny i wiomycyny [Johansen i wsp., 2006].

### **1.8.4. Mimikra molekularna**

Mimikra molekularna jest mechanizmem stosowanym przez prątki gruźlicy w celu neutralizacji fluorochinolonów, syntetycznych antybiotyków, które wykorzystywane są w leczeniu gruźlicy lekoopornej. Fluorochinolony są chemioterapeutykami, które zabijają komórki bakteryjne poprzez hamowanie replikacji, transkrypcji i naprawy DNA. Ich mechanizm działania opiera się na inhibicji gyrazy DNA. Nabyta oporność na fluorochinolony jest związana z występowaniem mutacji w genach kodujących gyrazę DNA - *gyrA* i *gyrB*. Natomiast naturalną oporność prątków na tę grupę antybiotyków przypisuje się białku MfpA (*ang. pentapeptide repeat protein*). Białko to tworzy strukturę, która wykazuje podobieństwo, pod względem rozmiaru, kształtu i ładunku elektrostatycznego, do DNA w formie B, dzięki czemu może wiązać się z gyrazą DNA, aby chronić ją przed fluorochinolonami [Ferber, 2005; Hegde i wsp., 2005].

### **1.8.5. Modyfikacja leku**

Mykobakterie mogą również inaktywować leki poprzez modyfikacje chemiczne, takie jak acetylacja. Aminoglikozydy są antybiotykami o szerokim spektrum działania, które stanowią ważny element w leczeniu gruźlicy. Pierwotną oporność *M. tuberculosis* na aminoglikozydy zapewnia acetylotransferaza Eis. Białko to pełni również istotną funkcję podczas wewnątrzkomórkowego przeżywania mykobakterii w makrofagach, poprzez zahamowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie prątkami (autofagię, proces zapalny, apoptozę) [Zaunbrecher i wsp., 2009]. Badania biochemiczne *in vitro* wykazały, że acetylotransferaza Eis acetyluje wiele aminowych grup aminoglikozydów, tym samym inaktywując antybiotyki. Ponadto wykazano, że Eis acetyluje nie tylko aminoglikozydy, ale także kapreomycynę, cykliczny antybiotyk peptydowy obecnie powszechnie stosowany w leczeniu gruźlicy MDR. Fakt, iż acetylotransferaza Eis chroni prątki zarówno przed systemem odpornościowym gospodarza jak i antybiotykami stanowi groźną koewolucję wirulencji i oporności na antybiotyki [Chen i wsp., 2011].

### **1.8.6. Degradacja leku**

Kolejną metodą, którą prątki wykorzystują do zwalczania działania antybiotyków, jest degradacja ich za pomocą hydrolaz. Mechanizm ten jest wykorzystywany przez mykobakterie do degradacji antybiotyków  $\beta$ -laktamowych, które praktycznie nie wykazują wpływu na prątki. U mykobakterii występują  $\beta$ -laktamazy, enzymy hydrolityczne, które hydrolizują pierścień  $\beta$ -laktamowy leków. Genom *M. tuberculosis* zawiera geny kodujące co najmniej cztery  $\beta$ -laktamazy, z których BlaC przypisuje się największe znaczenie. Powolna penetracja antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przez niskoprzepuszczalną ścianę komórkową prątków w połączeniu z aktywnością  $\beta$ -laktamazy zapewnia mykobakteriom skuteczną ochronę przed  $\beta$ -laktamami [Chambers i wsp., 1995; Tremblay i wsp., 2010].

### **1.8.7. Pompy oporności wielolekowej (ang. efflux pumps)**

Powszechnie stosowaną metodą unikania działania antybiotyków przez patogeny bakteryjne jest usunięcie ich z cytoplazmy przez system efflux [Machado i wsp., 2012]. Stwierdzono, że co najmniej 18 pomp efflux u mykobakterii nadaje im niskopoziomą

oporność na antybiotyki. Przykładami takich transporterów są: transporter IniBAC (oporność na izoniazyd i etambutol) oraz transporter Tap (wypompowywanie aminoglikozydów, tetracykliny i kwasu p-aminosalicylowego z komórek mykobakterii). Zwiększenie ekspresji genów kodujących pompy efflux, które usuwają określone leki z cytoplazmy komórki na zewnątrz przyczynia się do powstawania oporności na te leki na znacznie wyższym poziomie [Viveirosa i wsp., 2012].

#### **1.8.8. Aktywność bakteriobójcza leków a stres oksydacyjny u prątków**

Dla wielu gatunków bakterii, w tym prątków, wykazano korelację między opornością komórek bakteryjnych na antybiotyki a stresem oksydacyjnym. Związek pomiędzy opornością na antybiotyki i stresem oksydacyjnym u mykobakterii został po raz pierwszy potwierdzony w badaniach, które wykazały aktywację proleków izoniazydu i etionamidu przez białka stresu oksydacyjnego, takie jak KatG i AhpC [Scorpio i wsp., 1996]. Wykazano, że ekspresja reagującego na stres czynnika sigma F (SigF) jest indukowana przez antybiotyki. Ponadto, obecność mykotioli używanych przez prątki do obrony przed toksycznym działaniem tlenu jest wymagana dla oporności na antybiotyki [Vilcheze i wsp., 2008]. Wyniki badań nad systemami powiązаныmi z wielolekopornością prątków Lsr2 oraz WhiB7 wykazały ponadto wzajemne powiązania pomiędzy homeostazą redoks a opornością na antybiotyki [Burian i wsp., 2012].

#### **1.8.9. Tolerancja fenotypowa**

Tolerancja fenotypowa jest związana ze zmianami metabolicznymi lub fizjologicznymi, które nie są bezpośrednio związane z genami oporności na antybiotyki. Ta epigenetyczna tolerancja na leki odnosi się do tworzenia, pod wpływem określonych warunków środowiskowych, subpopulacji komórek przetrwałych (*ang. persists*) o mniejszej aktywności metabolizmu. Komórki te są genetycznie identyczne z ich podatnymi na leki odpowiednikami. Mogą one zmienić się z powrotem w komórki aktywnie dzielące się - podatne na antybiotyki, gdy warunki środowiskowe ponownie będą korzystne dla wzrostu bakterii [Lewis, 2008].



Podczas utajonej infekcji komórki *M. tuberculosis* wchodzą w stan podobny do uśpienia charakteryzujący się ograniczeniem ich metabolizmu, co prowadzi do zwiększonej tolerancji na antybiotyki [Gengenbacher i wsp., 2012]. Komórki *M. tuberculosis* wyizolowane bezpośrednio od pacjentów z utajoną lub nawracającą gruźlicą wykazywały zwiększoną tolerancję na ryfampicynę, izoniazyd i etambutol. Analizy transkryptomyczne tych komórek wykazały, że tolerancja leku jest spowodowana raczej niskim poziomem metabolizmu niż mutacjami opornościowymi [Garton i wsp., 2008].

### **1.9. Zależność między regulacją transkrypcji mykobakterii a opornością na antybiotyki.**

Obecne leczenie gruźlicy staje się coraz bardziej długotrwałe i nieskuteczne z powodu pojawienia się opornych na leki zmutowanych szczepów *Mycobacterium tuberculosis*. W adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska, a tym samym do nabywania m.in. oporności na antybiotyki służą dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału. W poprzednich rozdziałach przytoczono dane literaturowe świadczące o tym, że dwukomponentowy system transdukcji sygnału PdtA<sub>S</sub>/PdtA<sub>R</sub> działa na poziomie antyterminacji transkrypcji. W świetle tych danych, zasadne jest zatem pytanie o zależność pomiędzy regulacją transkrypcji a opornością na leki u prątków.

*Mycobacterium tuberculosis*, czynnik etiologiczny gruźlicy, jest naturalnie oporny na większość klinicznie dostępnych antybiotyków. Pierwotne systemy oporności obejmują niską przepuszczalność otoczki komórkowej, pompy oporności wielolekowej, systemy modyfikujące leki lub enzymy modyfikujące miejsca docelowe leków oraz modulację ekspresji genów. Zmiany w profilu transkrypcji mające na celu dostosowanie fizjologii prątków do warunków środowiska należą do głównych mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających mykobakteriom zwiększoną tolerancję na antybiotyki.

Wykazano, że białka z rodziny WhiB odgrywają kluczową rolę w aktywacji transkrypcji u bakterii [Burian i wsp., 2012]. Białko WhiB7, jest regulatorem transkrypcji genów, które przyczyniają się do pierwotnej oporności na antybiotyki u mykobakterii. Podczas antybiotykoterapii *whiB7* odgrywa istotną rolę w aktywacji transkrypcji

systemów oporności na antybiotyki: tetracykliny, makrolidy, linkozamidy i aminoglikozydy. Transkrypcja genu *whiB7* jest indukowana przez antybiotyki, jak również przez warunki stresowe, takie jak szok cieplny, niedobór żelaza i wejście do fazy stacjonarnej [Morris i wsp., 2005]. Istotnym jest fakt, iż indukcja genu *whiB7* następuje w komórkach *M. tuberculosis* wkrótce po infekcji gospodarza oraz w aktywowanych mysich makrofagach.

Z wykorzystaniem mikromacierzy DNA monitorowano zmiany ekspresji genów w odpowiedzi na izoniazyd. Szereg z nich umożliwia prątkom większą tolerancję na ten antybiotyk. Wykazano, że pod wpływem izoniazydu u prątków następuje nadekspresja genu *efpA*, który koduje pompę efflux umożliwiającą mykobakteriom aktywne wypompowywanie leków. Ponadto, w komórkach prątków, które nabyły oporność na izoniazyd wykryto obniżony poziom białka KatG – katalazy-peroksydazy, która jest niezbędna do aktywacji izoniazydu [Karakousis i wsp., 2008].

Kapreomycyna to cykliczny peptyd, który hamuje biosyntezę białek prątków przez wiązanie do 16S rRNA i 23S rRNA. Obecność tego antybiotyku indukuje u mykobakterii ekspresję genów kodujących: białka rybosomalne 30S i 50S, metylotransferazę Rv1988 oraz acetylotransferazę Eis, które zwiększają przeżywalność *M. tuberculosis* w makrofagach [Fu i wsp., 2007].

Kanamycyna jest lekiem drugiej linii stosowanym w leczeniu pacjentów z gruźlicą MDR. Antybiotyk ten działa poprzez wiązanie się z podjednostką 30S rybosomów, co zakłóca translację, a w konsekwencji syntezę białek. Zidentyfikowano zwiększoną ekspresję 98 genów oraz obniżoną ekspresję 198 genów *M. tuberculosis* w obecności kanamycyny. Geny regulowane pozytywnie kodują białka zaliczane do różnych kategorii funkcjonalnych takich jak: metabolizm ściany komórkowej, procesy komórkowe, wirulencja. Natomiast geny regulowane negatywnie były zaangażowane w metabolizm lipidów [Habib i wsp., 2017].

Fluorochinolony są stosowane w leczeniu gruźlicy jako leki drugiej linii. Zapobiegają podziałowi komórek poprzez zahamowanie aktywności gyrazy DNA, która należy do rodziny topoizomeraz typu II, zapobiegając w ten sposób replikacji bakteryjnego DNA. Ponadto inhibicja gyrazy DNA powoduje pojawienie się dwuniciowych pęknięć DNA,

co wywołuje odpowiedź SOS w komórkach bakterii. Z wykorzystaniem mikromacierzy oraz qRT-PCR zbadano wpływ hamujących stężeń cyprofloksacyny (FQ) na komórki prątków gruźlicy. Analiza mikromacierzy wykazała zwiększoną ekspresję 16 genów zaangażowanych w ochronę, naprawę i rekombinację DNA, w tym *recA* (zaangażowanego w odpowiedź SOS). Metodą qRT-PCR wykazano natomiast wzrost ekspresji genów *lexA* i *dnaE2*, dwóch innych składników odpowiedzi SOS [O'Sullivan i wsp., 2008].

## 2. Cel Pracy

**Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie udziału histydynowej kinazy PdtA5 oraz białka regulatorowego PdtAR w regulacji wybranych procesów metabolicznych mykobakterii.**

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

1. Konstrukcję ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtA5*.
2. Globalną analizę transkryptomów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtA5*.
3. Globalną analizę metaboliczną z wykorzystaniem technologii mikromacierzy fenotypowych dla szczepu  $\Delta pdtA5$  *M. smegmatis*.
4. Weryfikację danych otrzymanych z badań przesiewowych dotyczących zwiększonej wrażliwości szczepu  $\Delta pdtA5$  *M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe oraz zwiększonej oporności na tetracyklinę, poprzez określenie wartości MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost) z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Alamar blue.
5. Badając mechanizmy molekularne związane z obserwowanymi zmianami w lekooporności szczepu  $\Delta pdtA5$  *M. smegmatis*, poddano analizie ilościowej i jakościowej skład rybosomów, jako miejsca docelowego badanych klas antybiotyków.

### 3. Materiały

#### 3.1. Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne wykorzystywane w trakcie badań przedstawiono w Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Wykaz szczepów wykorzystywanych w pracy.

Gatunek	Nazwa szczepu	Źródło
<i>Escherichia coli</i>	Top 10	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	mc <sup>2</sup> 155	IBM PAN Łódź
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37Rv	IBM PAN Łódź

#### 3.2. Podłoża mikrobiologiczne

W przeprowadzonych badaniach wykorzystywano podłoża płynne i stałe. W przypadku podłóż LB wersję stałą uzyskiwano poprzez dodatek 2% agaru (BioShop). Wszystkie podłoża sterylizowano w temperaturze 121°C w czasie 20 minut.

- **Podłoże LB, pH 7**  
NaCl (Sigma) - 1%  
Trypton (BioShop) - 1%  
Ekstrakt drożdżowy (Difco) - 0,5%
- **7H9 – podłoże płynne Middlebrook, pH 7**  
7H9 (Difco) - 0,47%  
Tween 80 (Sigma) – 0,05 %  
OADC (Becton Dickinson) - 10%
- **7H10 – podłoże stałe Middlebrook, pH 7**  
7H10 (Difco) - 1,9%  
Glicerol (Sigma) - 0,5%  
OADC (Becton Dickinson) - 10%

### 3.3. Substancje dodawane do podłoży

- Antybiotyki wykorzystane w badaniach przedstawiono w **Tabeli 3.2.**

**Tabela 3.2.** Antybiotyki wykorzystane w badaniach.

Antybiotyk	Dawka
Ampicylina (Sigma)	100 µg/ml dla <i>E. coli</i>
Higromycyna B (BioShop)	200 µg/ml dla <i>E. coli</i>
	50 µg/ml dla <i>M. smegmatis</i>
Kanamycyna (Sigma)	50 µg/ml dla <i>E. coli</i>
	25 µg/ml dla <i>M. smegmatis</i>
Tetracyklina-HCl (BioShop)	25 ng/ml dla <i>M. smegmatis</i>

- Inne substancje dodawane do podłoży

X-gal (Sigma) - 40 µg/ml

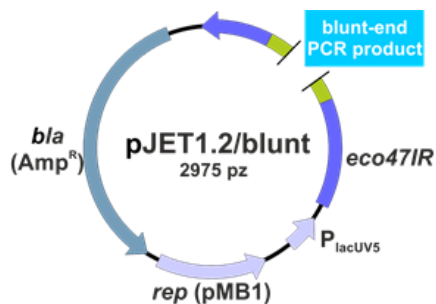
IPTG (Sigma) - 12 µg/ml

Sacharoza (BioShop) - 2%

Acetamid (Sigma) - 0,2%

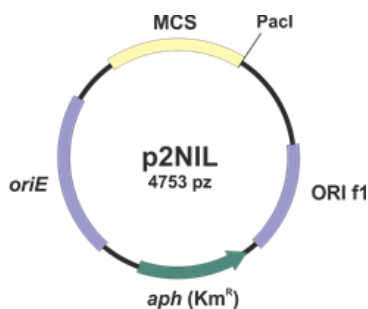
### 3.4. Wektory plazmidowe

- **pJET1.2/blunt Amp<sup>R</sup>** [Thermo Scientific] – komercyjny, wysokokopijny wektor plazmidowy używany do klonowania produktów PCR. Wektor ten zawiera: gen *rep* odpowiadający za replikację, gen *bla* nadający oporność na ampicylinę oraz samobójczy gen *eco47IR* kodujący endonukleazę Eco47IR, który zawiera sekwencję polilinkerową ułatwiającą pozytywną selekcję klonów.



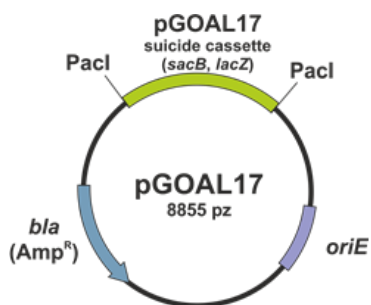
**Rycina 3.1.** Schemat budowy wektora plazmidowego pJET1.2/blunt.

- **p2NIL Kan<sup>R</sup>** [Parish i Stoker, 2000] - Wektor ten zawiera miejsce inicjacji replikacji dla *E. coli* (*oriE*) oraz gen *aph* nadający oporność na kanamycynę. Na wektorze znajduje się pojedyncze miejsce dla enzymu *PacI*, wykorzystywane do klonowania kasyety markerowej pochodzącej z wektora pGOAL17.



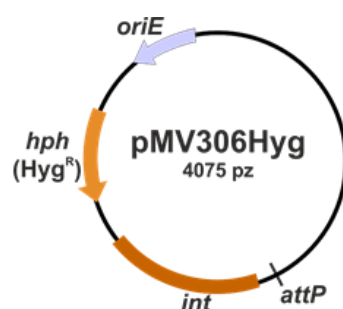
**Rycina 3.2.** Schemat budowy wektora plazmidowego p2NIL.

- **pGOAL17 Amp<sup>R</sup>** [Parish i Stoker, 2000] – Wektor ten zawiera: miejsce inicjacji replikacji dla *E. coli* (*oriE*), gen *bla* nadający oporność na ampicylinę oraz kasetę markerową, w której skład wchodzi geny *sacB* oraz *lacZ*. Gen *sacB* koduje lewanosacharazę, która przekształca sacharozę do toksycznego dla mykobakterii lewanu, natomiast gen *lacZ* koduje β-galaktozydazę, która ma zdolność rozkładu bezbarwnego X-galu do niebieskiej pochodnej.



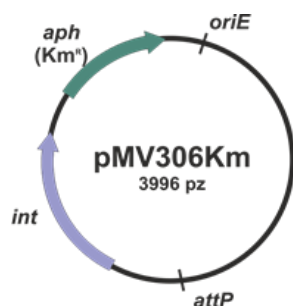
**Rycina 3.3.** Schemat budowy wektora plazmidowego pGOAL17.

- **pMV306H Hyg<sup>R</sup>** [Med-Immune Inc] – jest wektorem integracyjnym, zbudowanym z miejsca inicjacji replikacji *E. coli* (*oriE*) jak również systemu miejscowo-specyficznej rekombinacji (*ang. Site specific recombination - SSR*) pochodzącego z mykobakteriofaga L5. System SSR obejmuje gen *int*, który koduje integrazę oraz sekwencję pochodzenia fagowego *attP*, która dzięki aktywności integrazy pozwala wprowadzić plazmid w miejsce *attB* na chromosomie mykobakterii. Wektor ten zawiera również gen oporności na higromycynę *hph*.



**Rycina 3.4.** Schemat budowy wektora plazmidowego pMV306H.

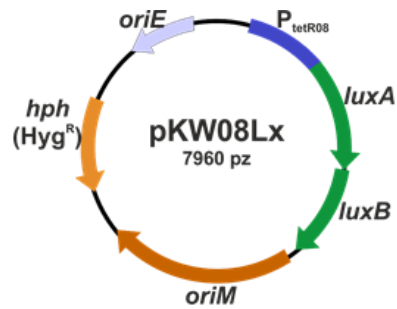
- **pMV306K Kan<sup>R</sup>** [Med-Immune Inc] – wektor ten jest pochodnym pMV306H. Zamiast genu oporności na higromycynę *hph* zawiera on gen oporności na kanamycynę *aph*.



**Rycina 3.5.** Schemat budowy wektora plazmidowego pMV306K.

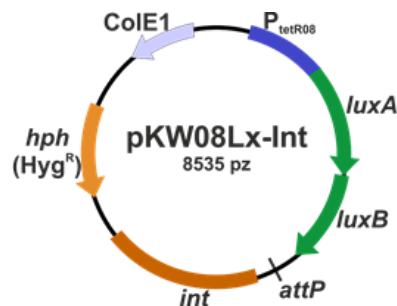
- **pKW08Lx Hyg<sup>R</sup>** [Williams i wsp., 2010] - posiada miejsce inicjacji replikacji dla *E. coli* (*oriE*) jak również miejsce inicjacji replikacji dla Mykobakterii (*oriM*). Ten wektor plazmidowy niesie również promotor tetracyklinowy (*tetRO8*), geny *luxA* i *luxB* kodujące lucyferazę oraz gen oporności na higromycynę *hph*.





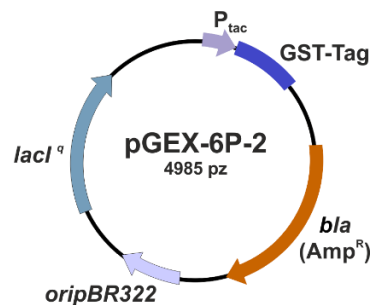
**Rycina 3.6.** Schemat budowy wektora plazmidowego pKW08Lx.

- **pKW08Lx-Int** [Williams i wsp., 2010] - plazmid integracyjny będący pochodnym plazmidu pKW08Lx. Zamiast miejsca inicjacji replikacji *oriM* posiada geny pochodzące z mykobakteriofaga L5 (*attP*, *int*).



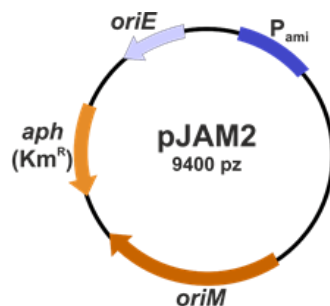
**Rycina 3.7.** Schemat budowy wektora plazmidowego pKW08Lx-Int.

- **pGEX-6P-2** [Amersham Biosciences] – posiada miejsce inicjacji replikacji *oriPBR322*. Niesie gen kodujący transferazę glutationu (GST-Taq) znajdujący się pod kontrolą promotora *tac* (indukowany IPTG). Wektor ten zawiera również gen *lacI<sup>q</sup>*, który koduje białko represorowe oraz gen oporności na ampicylinę.



**Rycina 3.8.** Schemat budowy wektora plazmidowego pGEX-6P-2.

- **pJAM2** [Triccas i wsp., 1998] - posiada miejsce inicjacji replikacji dla *E. coli* (*oriE*) i miejsce inicjacji replikacji dla Mykobakterii (*oriM*). Ten wektor plazmidowy niesie również promotor acetamidowy *P<sub>ami</sub>* oraz gen *aph* nadający oporność na kanamycynę.



**Rycina 3.9.** Schemat budowy wektora plazmidowego pJAM2.

W Tabeli 3.3. zamieszczono listę wektorów plazmidowych wykorzystanych w pracy badawczej.

**Tabela 3.3.** Wektory plazmidowe wykorzystane w pracy badawczej.

Nazwa wektora plazmidowego	Opis	Źródło
<b>komercyjne wektory plazmidowe</b>		
pJET 1.2/blunt	Wektor używany do klonowania produktów PCR, Amp <sup>R</sup>	Thermo Scientific
p2NIL	Wektor rekombinacyjny, nie replikujący w prątkach, Kan <sup>R</sup>	Parish i Stoker; 2000
pGOAL17	Wektor zawierający kasetę markerową Pacl z genami <i>sacB</i> oraz <i>lacZ</i> , Amp <sup>R</sup>	Parish i Stoker; 2000
pMV306H	Mykobakteryjny wektor integracyjny, Hyg <sup>R</sup>	Med-Immune Inc
pMV306K	Mykobakteryjny wektor integracyjny, Kan <sup>R</sup>	Med-Immune Inc
pKW08Lx	Mykobakteryjny wektor replikacyjny niosący indukowalny promotor P <sub>tet</sub> , Hyg <sup>R</sup>	Williams i wsp. 2010
pKW08Lx-Int	Mykobakteryjny wektor integracyjny niosący indukowalny promotor P <sub>tet</sub> , Hyg <sup>R</sup>	Williams i wsp. 2010
pJAM2	Wektor posiadający indukowalny promotor acetamidowy, Km <sup>R</sup>	Triccas i wsp. 1998
pGEX-6P-2	Wektor posiadający indukowalny promotor tac oraz GST-Tag, Amp <sup>R</sup>	Amersham Biosciences

Wektory plazmidowe skonstruowane w IBM PAN Łódź		
pKD1	Fragment 3' (448 pz) oraz sekwencje poniżej genu <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> o wielkości 807 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD2	Fragment 5' (79 pz) oraz sekwencje powyżej genu <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> o wielkości 1136 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD3	Fragment 3' (448 pz) oraz sekwencje poniżej genu <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> o wielkości 807 pz, wklonowany do wektora P2NIL, Kan <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD4	$\Delta$ <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> wraz z regionami flankującymi wklonowany do wektora P2NIL, Kan <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD5	Wektor pKD4 niosący kasetę markerową ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym PacI z wektora pGOAL17, Kan <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKL5	Gen <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> wklonowany do wektora replikacyjnego pKW08Lx zawierającego promotor P <sub>tet</sub> , Hyg <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pKD10	Gen <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i> pod kontrolą promotora P <sub>tet</sub> wklonowany do wektora integracyjnego pKW08Lx-Int, Hyg <sup>R</sup>	Praca doktorska
pMK220	Fragment 5' (109 pz) oraz sekwencje powyżej genu <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> o wielkości 1791 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pMK221	Fragment 3' (943 pz) oraz sekwencje poniżej genu <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> o wielkości 612 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pMK222	Fragment 5' (109 pz) oraz sekwencje powyżej genu <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> o wielkości 1791 pz, wklonowany do wektora P2NIL, Kan <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pMK223	$\Delta$ <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> wraz z regionami flankującymi wklonowany do wektora P2NIL, Kan <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pMK224	Wektor pMK223 niosący kasetę markerową PacI z wektora pGOAL17, Kan <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pKD11	Gen kodujący 16S rRNA wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska

pKD12	Gen kodujący 23S-5S rRNA wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska
pAB303	Gen <i>lacZ</i> wklonowany do wektora pMV306, Kan <sup>R</sup>	IBM PAN Łódź
pKD6	Wektor pJAM2 zdolny do ekspresji <i>M. tuberculosis pdtaS</i> (znacznik 6-His-tag), Kan <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD7	Wektor pGEX-6P-2 zdolny do ekspresji <i>M. tuberculosis pdtaS</i> (znacznik GST-tag), Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska
pKD8	Wektor pGEX-6P-2 zdolny do ekspresji <i>M. tuberculosis pdtaR</i> (znacznik GST-tag), Amp <sup>R</sup>	Praca doktorska

### 3.5. Syntetyczne oligonukleotydy

W Tabeli 3.4. zamieszczono wykaz syntetycznych oligonukleotydów wykorzystanych w niniejszej pracy doktorskiej.

**Tabela 3.4.** Syntetyczne oligonukleotydy wykorzystane w pracy doktorskiej.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja (5'>3')	Zastosowanie
<b>Oligonukleotydy wykorzystane podczas konstrukcji szczepów mutantów</b>		
Msmeg1918GR1ScaI-F	CAGTACTGATCACCGACTGGCAGCTG GC	knock-out genowy <i>pdtaS<sub>Ms</sub></i>
Msmeg1918GR2HindIII-R	CAAGCTTCGACCACCGCGTGCAGATG	
Msmeg1918GR3HindIII-F	CAAGCTTGCCAACCACATCCGCGACTC	
Msmeg1918GR4KpnI-R	CGGTACCGCGCGCCCGATTAGGAGTT	
Rv3220cPdtaSGR1-KpnI <sub>nat</sub> -F	ACGGTACCAATCTCAAGGCCTGG	knock-out genowy <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i>
Rv3220cPdtaSGR2HindIII-R	CAAGCTTACGACAAGTCGGCAAGGAG CTG	
Rv3220cPdtaSGR3HindIII-F	CAAGCTTCGGGAAATCCATCATCGGG TTAAGA	
Rv3220cPdtaSGR4ScaI-R	CAGTACTTTGTGTTCTGTCCAAGTCC AGTC	
Msp <sub>pdtaS</sub> -probe-F	CCTGCAGACCGTCCCGC	hybrydyzacja typu

MspdtaS-probe-R	CGGCCGTACGAGCGTCC	Southern Blotting - <i>M. smegmatis</i>
RvpdtaS-probe-F	GGCTCGCCGGACGTCCAA	hybrydyzacja typu
RvpdtaS-probe-R	TCTGCAGGCCAGGCTGTCC	Southern Blotting - <i>M. tuberculosis</i>
<b>Oligonukleotydy użyte do amplifikacji genów</b>		
MsmPdtaSKW08_F	CTACTCTCATCGTGGAACTCTGACAGG ATCCAGAGGAGCCTGAGTTCGCCCT CGGTGATCTGCT	Amplifikacja <i>pdtaS</i>
MsmPdtaSKW08_R	TCTAGGGTCCCAATTAATTAGCTAAAG CTTCTACTGCGC GCCCCGGCTG	
16S_F_pJET_KpnI	TAGGTACCCTCTGACCTGGGGATTTG	Konstrukcja wektorów stosowanych do normalizacji danych qRT-PCR
16S_R_pJET_XbaI	TATCTAGAGTTTCCCCATTTCGGACATC C	
23S_5S_F_pJET	GTAAGTTCGACCTGCACGA	
23S_5S_R_pJET	GGGTGATTCTAATTTGTGTTTCG	
RvpdtaS-jam2Bam-F	CGGATCCATGTCCCACTCGGTGATCT GCTCG	Użyte do wklonowania genu <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> do wektora pJAM2
RvpdtaS-jam2Xba-R	CTCTAGACAGCATCAACCGTCCCCGGC	
RvpdtaS-jam2Bam-F	CGGATCCATGTCCCACTCGGTGATCT GCTCG	Użyte do wklonowania genu <i>pdtaS<sub>Mtb</sub></i> do wektora pGEX-6P-2
RvpdtaS-GEXstop-Not-R	GCGGCCGCTACAGCATCAACCGTCCC CGGC	
Rv1626-BamHI-F	CGGATCCATGACCGACCGCCACACG ATT	Użyte do wklonowania genu <i>pdtaR<sub>Mtb</sub></i> do wektora pGEX-6P-2
Rv1626-stop-EcoRI	GGAATTCCTACGACTCCTCGCCGCGGC A	
<b>Oligonukleotydy użyte do hybrydyzacji typu Northern blot</b>		
23S ITS	CCGTGGAGTGTGGTTGCGAG	sondy oligonukleotydowe komplementarne do elementów operonu <i>rrn</i>
mature 16S	CCACCGGCTTCGGGTGTTACC	
16S ITS	AGCCGGCGCCACTACAGCGCT	
mature 5S	GCGGTGTCTACTTTCCACC	

<b>Oligonukleotydy użyte do reakcji odwrotnej transkrypcji</b>		
16SRT_RC	CAGGAATTCAGTCTCCCCT	synteza cDNA
23SRT_RC	CACCAGGCACTGTCCCTGAA	
5SRT_RC	TTCGGCGGTGTCCTACTTTT	
<b>Oligonukleotydy użyte do analizy ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)</b>		
16S_F_SYBR	CCGGAATTACTGGGCGTAAA	transkrypt 16S rRNA
16S_R_SYBR	AGTACTCTAGTCTGCCCGTATC	
23S_F_SYBR	CGATACGGTTTGTGTAGGATAGG	transkrypt 23S rRNA
23S_R_SYBR	GGATATACGGTCCGAGGTTAGA	
5S_F_SYBR	GTTACGGCGGTCCATAGC	transkrypt 5S rRNA
5S_R_SYBR	ACCCGGAAGGGTAGTATCAT	

### 3.6. Enzymy

- Enzymy użyte w reakcji PCR
  - Polimeraza DNA AccuPrime Pfx (Invitrogen) - 5 U/μl
  - Polimeraza DNA KAPA Taq (KAPA BIOSYSTEMS) - 5 U/μl
- Enzymy użyte do procesów łączenia fragmentów DNA
  - Ligaza T4 (Fermentas) - 20 U/μl
  - Polimeraza DNA T4 (Invitrogen) - 5 U/μl
- Enzymy użyte do trawienia DNA
  - TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) - 5 U/μl
- Enzymy użyte do trawienia RNA
  - RNaza (Sigma-Aldrich) - 1 U/μl
- Enzymy restrykcyjne FastDigest™(Fermentas) : BamHI, EcoRI, HindIII, KpnI, NcoI, NotI, PaeI, ScaI, XbaI

### 3.7. Mieszaniny reakcyjne

- **Mieszanina do amplifikacji DNA (PCR)**

DNA – 20-100 ng

bufor 10x stężony - 5  $\mu$ l

DMSO (Sigma) - 2  $\mu$ l

dNTP mix 2,5 mM (Fermentas) - 1  $\mu$ l

starter przedni 10  $\mu$ M - 1  $\mu$ l

starter wsteczny 10  $\mu$ M - 1  $\mu$ l

polimeraza DNA - 1 U

H<sub>2</sub>O do końcowej objętości - 50  $\mu$ l

- **Mieszanina do łączenia fragmentów DNA z wykorzystaniem ligazy DNA T4**

wektor plazmidowy - od 20 do 100 ng

DNA wstawki - od 1 do 5 objętości plazmidu

bufor 10x stężony - 2  $\mu$ l

ligaza DNA T4 - 1 U

H<sub>2</sub>O do o końcowej objętości - 20  $\mu$ l

- **Mieszanina do trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi**

DNA - 1  $\mu$ g

bufor 10x stężony - 2  $\mu$ l

enzym - 1 U

H<sub>2</sub>O do objętości końcowej - 20  $\mu$ l

- **Mieszanina do syntezy cDNA**

RNA - 1  $\mu$ g

heksanukleotyd starterowy - 1  $\mu$ l

bufor reakcyjny - 1  $\mu$ l

H<sub>2</sub>O DEPC do objętości końcowej - 8  $\mu$ l

2xFirst-Strand Reaction Mix - 10  $\mu$ l

SuperScript™III/RNase OUT™ Enzyme Mix - 2  $\mu$ l

- **Mieszanka do qRT-PCR**

cDNA - 50 ng

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix - 12,5 µl

Oligonukleotydy (10 µM) - po 0,75 µl

H<sub>2</sub>O DEPC do objętości końcowej - 25 µl

### **3.8. Bufory i roztwory**

#### **3.8.1. Bufory użyte do przygotowania komórek kompetentnych *Escherichia coli***

##### **Bufor I, pH 8**

CH<sub>3</sub>COOK - 30 mM

MnCl<sub>2</sub> - 50 mM

RbCl - 100 mM

CaCl<sub>2</sub> - 10 mM

Glicerol - 15%

##### **Bufor II, pH 7**

NaMOPS - 10 mM

CaCl<sub>2</sub> - 75 mM

RbCl - 10 mM

glicerol - 15%

#### **3.8.2. Bufory i roztwory użyte do hybrydyzacji metodą Southern Blot**

- **Bufor depurynujący**

HCl - 0,25 M

- **Bufor denaturujący**

NaCl - 1,5 M

NaOH - 0,5 M

- **Bufor neutralizujący, pH 7,5**

NaCl - 1,5 M

Tris-HCl - 0,5 M



- **Bufor SSC (20x stężony), pH 7**

cytrynian sodu - 0,3 M

NaCl - 3 M

- **Bufor hybrydyzacyjny**

NaCl - 0,5 M

odczynnik blokujący - 4%

- **Bufor przemywający I**

mocznik - 2 M

SDS - 0,1%

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7 - 50 mM

NaCl - 150 mM

MgCl<sub>2</sub> - 1 mM

odczynnik blokujący - 0,2%

- **Bufor przemywający II (20x stężony), pH 10**

NaCl - 2 M

Tris-HCl - 1 M

- **Bufor przemywający II**

bufor przemywający II (1x stężony)

MgCl<sub>2</sub> - 0,2 mM

### 3.8.3. Bufor do badania aktywności $\beta$ - galaktozydazy

- **Bufor PM2**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  - 70 mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  - 30 mM

$\text{MgSO}_4$  - 1 mM

$\text{MnSO}_4$  - 0,2 mM

$\beta$ -merkaptoetanol - 100 mM

### 3.8.4. Bufory do elektroforezy

- **Bufor TAE (50x stężony) - elektroforeza DNA w żelach agarozowych, pH 8**

Tris-base - 2 M

EDTA pH 8 - 50 mM

pH doprowadzono przy użyciu kwasu octowego

- **Bufor TGB (10x stężony) - elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych**

Tris-base - 250 mM

glicyna - 2,5 M

SDS - 1%

- **Bufor NBC - elektroforeza RNA w żelu agarozowym, pH 7,5**

kwas borowy - 50 mM

octan sodu - 1 mM

NaOH - 5 mM

### 3.8.5. Bufory do oczyszczania białek

- **Bufory do oczyszczania białek w fuzji ze znacznikiem His, pH 7,5**

**Wiążący i płuczający**

Imidazol - 10 mM

NaCl – 0,5 M

Tris-HCl pH=7,5 – 20 mM

**Do elucji**

Imidazol – 1 M

NaCl – 0,5 M

Tris-HCl pH=7,5 – 20 mM

- **Bufory do oczyszczania białek w fuzji ze znacznikiem GST**

**Wiążący i płuczący (PBS), pH 7,3**

NaCl - 0,14 M

KCl - 2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 1,8 mM

**Do elucji**

zredukowany glutation - 7,5 mM

Tris-HCl pH 8 - 50 mM

### 3.8.6. Inne bufory i roztwory

- **Mieszanina do izolacji chromosomalnego DNA**

chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1

- **Bufor TE**

Tris-HCl pH 8 - 10 mM

EDTA (Serva) pH 8 - 1 mM

- **50 mM Bufor PB, pH 7**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O – 0,0289 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,0211 M

pH doprowadzono przy użyciu 1 M KOH

- **Bufor do lizy wykorzystany w analizie rybosomu bakteryjnego**

HEPES pH 7,5 - 20 mM

KCl - 200 mM

MgCl<sub>2</sub> - 5 mM

Triton X-100 - 1%

DTT - 2 mM

DNaza - 5 U/ml

- **Bufor do fosforylacji**

Tris-HCl pH 7,5 - 50 mM

KCl - 50 mM

DTT - 1 mM

### 3.9. Żele użyte w procesie elektroforezy

#### 3.9.1. Żel agarozowy do elektroforezy

1 % agaroz (BioShop) w buforze TAE

1% Et-Br (Serva)

#### 3.9.2. Żel poliakrylamidowy do pionowej elektroforezy białek

- **Żel rozdzielający**

30% akrylamid (BioRad) - 12%

Tris-HCl pH 8,8 (Serva) - 0,36 M

SDS (Sigma) - 0,1%

APS (Sigma) - 0,1%

TEMED (Sigma) - 0,1%

H<sub>2</sub>O

- **Żel zatężający**

30% akrylamid (BioRad) - 5%

Tris-HCl pH 6,8 (Serva) - 0,1 M

SDS (Sigma) - 0,1%

APS (Sima) - 0,1%

TEMED (Sigma) - 0,1%

H<sub>2</sub>O

### 3.10. Barwniki obciążające

- **Bufor obciążający do DNA (6×stężony)**

Glicerol - 30%

Błękit bromofenolowy - 0,25%

- **Bufor obciążający do białek (4×stężony), pH 6,8**

Glicerol - 40%

Błękit bromofenolowy - 0,4%

SDS - 8%

DTT - 400 mM

Tris-HCl - 200 mM

### 3.11. Markery wielkości

- **Markery do określania wielkości DNA**
  - GeneRuler™ 1 kb (Thermo Scientific) zawiera fragmenty DNA o wielkościach: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz
  - GeneRuler™ 100 pz (Thermo Scientific) zawiera fragmenty DNA o wielkościach: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz
- **Markery do określania wielkości białek**
  - PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) zawiera rekombinowane białka o wielkościach : 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 250 kDa
  - PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) zawiera rekombinowane białka o wielkościach : 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 180 kDa

### 3.12. Zestawy komercyjne wykorzystane w pracy

- Do izolacji plazmidowego DNA - Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System firmy Promega
- Do elucji DNA z żelu agarozowego - QIAEX II Gel Extraction Kit firmy Qiagen
- Do oczyszczania produktów reakcji PCR - GeneJET PCR Purification Kit firmy Thermo Scientific
- Do hybrydyzacji typu Southern - Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System firmy Amersham Biosciences
- Do immunoenzymatycznego testu wnikania streptomycyny do komórek - Green Spring Streptomycin ELISA firmy Antibodies-online
- Do odwrotnej transkrypcji - SuperScript III FirstStrand Synthesis SuperMix firmy Invitrogen
- Do qRT - PCR - Maxima SYBR green qPCR master mix firmy Life Technologies
- Do rybodeplekcji - Ribo-Zero rRNA Removal Kit firmy Illumina

- Do przygotowania bibliotek w analizie RNA-Seq - KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit firmy KAPA BIOSYSTEMS
- Do analizy bibliotek - Agilent DNA 1000 Kit firmy Agilent
- Do oznaczania molarności bibliotek - NEBNext Library Quant Kit for Illumina firmy New England Biolabs
- Do oznaczania stężenia białka - BCA Protein Assay Reagent Kit firmy Thermo Scientific

### **3.13. Pozostałe odczynniki i materiały**

- DNA-zol (Invitrogen)
- Ditiotretitol (DTT) (Sigma-Aldrich)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich)
- TRIzol (Invitrogen)
- Woda DEPC (Ambion)
- DETA-NO (Sigma-Aldrich)
- Menadion (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Polmos)
- Izopropanol (MERCK)
- Chloroform (Sigma)
- CH<sub>3</sub>COOK - octan potasu (Sigma)
- Glicerol (Sigma)
- Instant Blue (Expedeon)
- 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- Kulki cyrkonowe 0,1 mm (BioSpec Products)
- Kulki krzemionkowe 0,1 mm (MP Biomedicals)
- Kulki magnetyczne AMPure XP (Beckman Coulter)
- Mieszanina nukleotydów dNTP Mix (Thermo Scientific)
- Alamar Blue (Sigma)
- Filtry strzykawkowe o średnicy porów 0,22 μm (TPP)
- Bibuła chromatograficzna (Whatman)

- Membrana nylonowa Amersham Hybond-N (GE Healthcare)
- Klisze rentgenowskie Pierce CL-Xposure (Thermo Scientific)
- Kasetka rentgenowska (Carl Roth)
- Butelki hodowlane 25cm<sup>2</sup> (Corning)
- 96-dołkowe płytki polistyrenowe (Nunc)
- Kuwety do elektroporacji (Sigma-Aldrich)

### **3.14. Aparatura**

- Wirówka do probówek typu Eppendorf - MiniSpin firmy Eppendorf
- Wirówka do probówek typu Falcon – 5804 firmy Eppendorf
- Spektrofotometr/Fluorymetr - DS-11 FX firmy DeNovix
- Spektrofotometr do płytek 96-dołkowych - Benchmark Plus firmy BIO-RAD
- Termocykler 96-dołkowy - Applied firmy Biosystems
- Homogenizator - FastPrep-24 MP firmy Biomedicals
- Sekwencjator - NextSeq 500 firmy Illumina
- Urządzenie do real-time PCR - 7900HT firmy Applied Biosystems
- Zautomatyzowany inkubator - OmniLog firmy BIOLOG
- Skaner fluorescencyjny - Typhoon 8600 Imager Scanner firmy GE Healthcare
- Urządzenie do wywoływania filmów rentgenowskich - Medical X-ray Processor firmy Kodak
- Wytrząsarka firmy Infors Orbitron
- Urządzenie do elektroporacji firmy BioRad
- Aparat UV -Stratalinker 1800 firmy Stratagene
- Urządzenie Agilent 2100 Bioanalyzer firmy Agilent
- Ultrawirówka ThermoSorvallWX90 firma Thermo Scientific
- Skaner fluorescencyjny Typhoon 8600 Imager Scanner firmy GE Healthcare
- Urządzenie do wyznaczania gęstości mikroorganizmów DENSILAMETR II firmy Erba Lachema
- System AKTA firmy GE Healthcare

## 4. Metody

### 4.1. Hodowle bakteryjne

Wykorzystane w badaniach szczepy *E. coli* hodowano w temperaturze 37°C. Hodowlę płynną prowadzono standardowo przez 16 do 24 godzin w probówkach lub kolbach, na wytrząsarce o ruchu obrotowym (Infors Orbitron, 140 rpm) z pożywką LB. Hodowle na podłożu stałym prowadzono na szalkach Petriego z pożywką LB zestaloną agarem.

Wykorzystany w badaniach szczep *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 hodowano w temperaturze 37°C. Hodowlę płynną prowadzono standardowo przez 16 do 24 godzin w probówkach lub kolbach, na wytrząsarce o ruchu obrotowym (Infors Orbitron, 140 rpm) z pożywką Middlebrook 7H9 uzupełnioną o OADC (kwas oleinowy / albumina / dekstroza / katalaza) oraz 0,05% Tween 80. Hodowle na podłożu stałym prowadzono na szalkach Petriego z wykorzystaniem podłoża Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC i glicerolu 0,5%.

Wykorzystany w badaniach szczep *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv hodowano w temperaturze 37°C. Hodowlę płynną prowadzono standardowo przez 2-3 tygodnie w butelkach hodowlanych wypełnionych pożywką Middlebrook 7H9/OADC/Tween 80. Hodowle na podłożu stałym prowadzono na szalkach Petriego z wykorzystaniem podłoża Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC i glicerolu.

Selekcję mikroorganizmów uzyskiwano poprzez dodatek do podłoży odpowiednich antybiotyków oraz/lub innych substancji, w zależności od prowadzonych badań.

### 4.2. Izolacja plazmidowego DNA z komórek *E. coli*

Izolację plazmidowego DNA wykonano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta.



### **4.3. Izolacja chromosomalnego DNA z komórek *M. smegmatis***

Izolację chromosomalnego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem metody mechanicznej dezintegracji komórek. Procedura obejmowała:

- zawieszenie biomasy bakteryjnej w buforze TE,
- rozbicie komórek bakteryjnych z wykorzystaniem cyrkoniowych kulek o średnicy 0,1 mm,
- lizę uszkodzonych komórek z wykorzystaniem DNA-zolu,
- oczyszczenie izolowanego DNA mieszaniną chloroformu:alkoholu izoamylowego,
- precipitację DNA z wykorzystaniem etanolu,
- Trawienie RNA, które zanieczyszcza końcowy produkt, z użyciem RNA-zy.

### **4.4. Amplifikacja DNA przy pomocy reakcji PCR**

DNA amplifikowano z wykorzystaniem polimerazy DNA (AccuPrime Pfx lub KAPA Taq) i zalecanego przez producenta buforu, w końcowej objętości wynoszącej 50  $\mu$ l. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze. Procedura amplifikacji obejmowała wstępną denaturację dwuniciowego DNA (temperatura 95°C), po której następowało 35 powtarzających się cykli, które obejmowały:

- denaturację trwającą 30 sekund (temperatura 95°C),
- przyłączanie oligonukleotydów trwające 45 sekund (temperatura zależna od temperatury mięknienia syntetycznych oligonukleotydów),
- wydłużanie łańcucha trwające 60 sekund na każde 1000 pz (temperatura 68°C lub 72°C - w zależności od użytej polimerazy)

Końcowym etapem była elongacja przez 15 minut w temperaturze zależnej od polimerazy, a następnie schłodzenie próbek do 4°C.

#### **4.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi**

DNA trawiono przy użyciu odpowiednich enzymów restrykcyjnych z wykorzystaniem buforu zgodnie z zaleceniami producenta (Fermentas) w objętości końcowej 20  $\mu$ l. Reakcję prowadzono w temperaturze 37°C przez 30 minut.

#### **4.6. Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym**

Elektroforeza pozioma z wykorzystaniem żelu agarozowego służyła jako narzędzie do rozdziału preparatów DNA. Rozdział następował w oparciu o różnice wielkości cząsteczek DNA. Elektroforezę prowadzono w buforze TAE przy napięciu 5V na każdy centymetr odległości między elektrodami w temperaturze pokojowej. Rozdzielone fragmenty kwasów deoksyrybonukleinowych wizualizowano dzięki obecności w żelu bromku etydyny, w świetle UV przy długości fali 305 nm.

#### **4.7. Elucja DNA z żelu agarozowego**

Elucję DNA z żelu agarozowego przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu QIAEX II Gel Extraction Kit, postępując według zaleceń producenta.

#### **4.8. Precypitacja DNA**

Precypitację DNA wykonywano z wykorzystaniem dwóch metod:

- zawieszając DNA w zimnym 96% etanolu (3 objętości próbki DNA) z dodatkiem 5 M octanu potasu (0,1 objętości), a następnie inkubując tak powstałą mieszaninę przez 1 godzinę w -70°C,
- zawieszając DNA w izopropanolu (o objętości próbki DNA) z dodatkiem 5 M octanu potasu (0,1 objętości), a następnie inkubując tak powstałą mieszaninę przez 10 minut w temperaturze pokojowej.

Następnie, tak przygotowane próbki wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C i prędkości 14000 rpm, ponownie płukano etanolem po czym wirowano i wysuszony osad DNA zawieszano w 12  $\mu$ l dejonizowanej wody.

#### **4.9. Łączenie fragmentów DNA**

Fragmenty DNA łączono z wykorzystaniem ligazy DNA T4 używając buforu dołączonego przez producenta, w objętości końcowej 20  $\mu$ l, temperaturze 22°C i czasie 1 godziny.

#### **4.10. Oczyszczanie produktów PCR**

Produkty reakcji PCR oczyszczano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu odczynników GeneJET PCR Purification Kit firmy Thermo Scientific postępując według instrukcji zamieszczonej przez producenta.

#### **4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA**

Pomiar stężenia DNA oraz RNA wykonywano z wykorzystaniem aparatu DS-11 FX firmy DeNovix uzyskując wyniki w jednostce ng/ $\mu$ l.

#### **4.12. Sekwencjonowanie fragmentów DNA**

Poprawność uzyskanych sekwencji DNA sprawdzano wykorzystując sekwencjonowanie metodą Sanger na urządzeniu Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems), we współpracy z dr Małgorzatą Korycką-Machałą z Instytutu Biologii Medycznej PAN.

#### **4.13. Transformacja szczepów *E. coli***

Komórki kompetentne *E. coli* oraz procedurę ich transformacji z użyciem chlorku rubidu prowadzono zgodnie z protokołem opisanym w Sambrook i wsp. w 1998 roku [Sambrook i wsp. 1998].

#### **4.14. Elektrotransformacja komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis***

W celu przeprowadzenia transformacji obcego DNA do komórek *Mycobacterium smegmatis* wykorzystywano metodę elektroporacji. Technika ta polega na zwiększeniu przepuszczalności osłon komórkowych dla obcego materiału genetycznego poprzez destabilizację osłon komórkowych spowodowaną impulsem elektrycznym. Procedurę przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Parish i Stocker w 2001r. Pierwszy etap pracy obejmował przygotowanie komórek kompetentnych *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*. Komórki kompetentne *M. tuberculosis* przygotowywano w temperaturze 37°C, natomiast *M. smegmatis* analogicznie w schłodzonych warunkach. Kolejny etap pracy obejmował transformację komórek kompetentnych metodą elektroporacji. Do przygotowanych komórek kompetentnych dodano plazmidowy DNA, elektrotransformację prowadzono w kuwecie z wykorzystaniem aparatu do elektroporacji (napięcie 2,5 kV, opór 1000  $\Omega$ , pojemność elektryczna 25  $\mu\text{F}$ ). Po elektroporacji komórki umieszczano w 5 ml podłoża płynnego Middlebrook 7H9/OADC i inkubowano 24 godziny w 37°C. Po inkubacji komórki wysiano na podłoże Middlebrook 7H10/OADC, z odpowiednimi czynnikami selekcyjnymi i inkubowano od 4 do 6 tygodni w 37°C (*M. tuberculosis*) lub 3-5 dni (*M. smegmatis*) [Parish i Stocker, 2001].

#### **4.15. Konstrukcja wektorów do nadekspresji rekombinowanych białek**

Konstrukcja wektorów do nadekspresji rekombinowanych białek wymagała amplifikacji badanych genów *pdtA*S oraz *pdtA*R na matrycy chromosomalnego DNA *M. tuberculosis* H37Rv. Otrzymane produkty PCR zostały wklonowane do wektorów

ekspresyjnych posiadających promotor indukowalny IPTG pGEX-6P-2 (GST-tag) lub dodatkiem acetamidu pJAM2 (6-His-tag). Uzyskane wektory plazmidowe pKD7, pKD8 i pKD6 wtransformowano odpowiednio do komórek *E. coli* BL21 i *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

#### **4.16. Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek *E. coli* BL21**

Hodowlę rekombinowanych szczepów *E. coli* niosących plazmidy umożliwiające ekspresję białek PdtaS i PdtaR prowadzono w 37°C do uzyskania gęstości optycznej hodowli pomiędzy OD<sub>600</sub>=0,6, a OD<sub>600</sub>=0,8. Następnie, ekspresję białek indukowano IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd) (400 mM). Po całonocnej inkubacji w 20°C uzyskaną biomasę komórek zwirowano i zamrożono w -20°C. Białka PdtaS i PdtaR oczyszczono z frakcji rozpuszczalnej, według procedury opisanej przez Kuron i wsp. w 2014 roku, metodą chromatografii powinowactwa z zastosowaniem kolumn zawierających agarozę glutationową (Pierce) dla białek znakowanych S-transferazą glutationową (GST). Skład buforów do oczyszczania białek zamieszczono w rozdziale **Materiały 3.8.5**. Uzyskane preparaty białek zatężano przy użyciu koncentratorów Amicon Ultra 4-ml z błoną polietersulfonową (Merc). Stężenie białek oznaczano z wykorzystaniem metody z kwasem bichoninowym (BCA). Metodę BCA wykonywano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu firmy Bio-Rad, zgodnie z zaleceniami producenta [Kuron i wsp., 2014].

#### **4.17. Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155**

Białko PdtaS zostało również oczyszczone z komórek *M. smegmatis* hodowanych w podłożu 7H9/OADC z dodatkiem kanamycyny w temperaturze 37°C. Hodowlę prowadzono do uzyskania gęstości optycznej pomiędzy OD<sub>600</sub>=0,8, a OD<sub>600</sub>=1. Następnie, ekspresję białka indukowano dodając acetamid (0,004%), hodowlę inkubowano w 37°C przez noc. Uzyskaną biomasę komórek zwirowano, zawieszono w buforze wiążącym. Następnie komórki sonikowano (sonda ultradźwiękowa firmy Bioblok) i zwirowano

w celu oddzielenia frakcji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych (16000 rpm, 4°C, 40 minut). Białko PdtaS oczyszczono z frakcji rozpuszczalnej, metodą chromatografii powinowactwa z zastosowaniem kolumny zawierającej złożę Ni-NTA (Qiagen) dla białek z etykietą His. Skład buforów do oczyszczania białek zamieszczono w rozdziale **Materiały 3.8.5**. Uzyskany preparat rekominowanego białka zatężano przy użyciu koncentratorów Amicon Ultra (Merc), a stężenie określano metodą BCA.

#### **4.18. Elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS – PAGE)**

Elektroforeza pionowa w żelu poliakrylamidowym była wykorzystywana do rozdzielania białek. Żele SDS-PAGE przygotowywano zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale **Materiały 3.9.1**. Do badanych próbek dodawano barwnik obciążający 4xSB (**Materiały 3.10.**), denaturowano 5 minut w 98°C, po czym próbki наносono na żel poliakrylamidowy. Elektroforezę prowadzono z wykorzystaniem buforu TGB przy napięciu prądu 140 V. Wizualizację białek w żelu uzyskiwano poprzez barwienie komercyjnym odczynnikiem Instant Blue™ firmy Expedeon.

#### **4.19. Autofosforylacja białka i fosfotransfer**

Autofosforylację białka PdtaS (2,5 μM) prowadzono w buforze do fosforylacji (**Materiały 3.8.6**) z dodatkiem 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Mg<sup>2+</sup>) oraz 10 mM CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>). Reakcję autofosforylacji inicjowano przez dodatek <sup>32</sup>P-ATP, a następnie inkubowano przez 5, 10 i 30 minut w 37°C. Do reakcji fosfotransferu wykorzystano białko PdtaS preinkubowane przez 10 minut. Do mieszaniny dodawano białko PdtaR (4 μM) i inkubowano w 37°C przez 5, 10 i 15 minut. Następnie białka rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Żel transferowano na ekran do obrazowania radioizotopów przez 24 godziny. Fosforylację białek wizualizowano z wykorzystaniem aparatu Typhoon 8600 Imager Scanner (GE Healthcare).

#### 4.20. Konstrukcja wektora do rekombinacji homologicznej

Konstrukcja wektora do rekombinacji homologicznej obejmowała wklonowanie badanego genu z wewnętrzną delecją wraz z fragmentem DNA otaczającym gen oraz kasety markerowej pochodzącej z wektora pGOAL17, do wektora plazmidowego p2NIL. Uzyskany wektor do rekombinacji homologicznej niósł zatem geny markerowe: *aph* nadający komórkom oporności na kanamycynę, *sacB* warunkujący wrażliwość komórek na sacharozę oraz *lacZ* odpowiedzialny za nadawanie komórkom zdolności do rozkładu X-galu. Obecność genów markerowych pozwala na przeprowadzenie selekcji otrzymanych rekombinowanych szczepów na etapie powstawania mutantów SCO (pojedynczych krzyżowych rekombinantów) i DCO (podwójnych krzyżowych rekombinantów).

#### 4.21. Otrzymywanie mutantów SCO i DCO

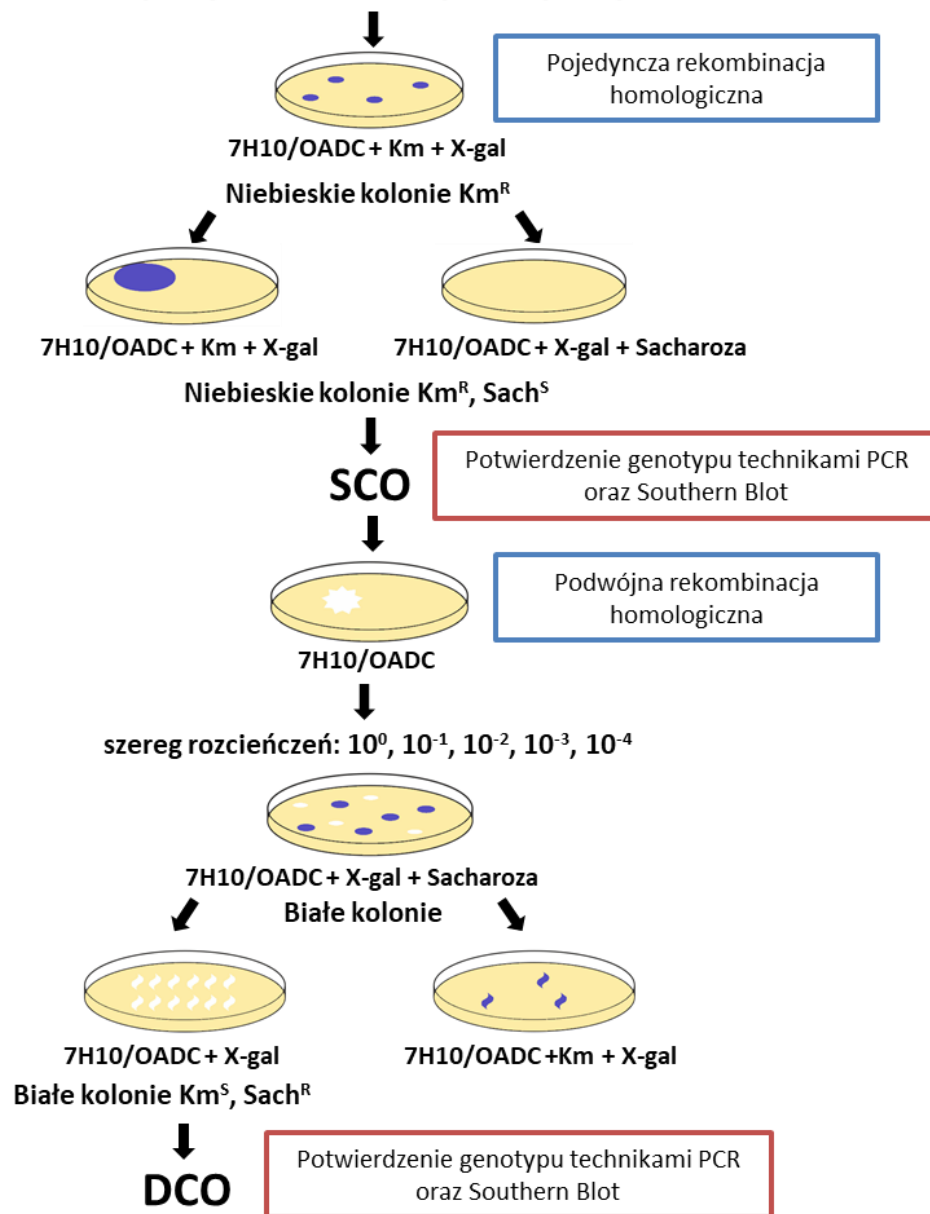
Uzyskane wektory plazmidowe do rekombinacji homologicznej zostały elektroporowane odpowiednio do komórek kompetentnych *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis*. W wyniku pojedynczej rekombinacji homologicznej zachodzi integracja plazmidowego DNA do chromosomu komórek mykobakterii w sąsiedztwie sekwencji homologicznych. Uzyskane w ten sposób mutanty SCO nabywają cech kodowanych przez geny obecne na plazmidzie. Obecność genów *aph*, *lacZ* oraz *sacB* umożliwia selekcję mutantów SCO, w genomie których znajduje się zarówno „dzika” oraz zmutowana kopia badanego genu.

W wyniku podwójnej rekombinacji homologicznej uzyskuje się mutanty DCO. W procesie tym utracony zostaje plazmidowy DNA niosący geny markerowe oraz jednocześnie dochodzi do delecji „dzikiej” lub zmutowanej kopii badanego genu. Mutanty te w swoim genomie posiadają zatem jedynie „dziką” lub zmutowaną kopię badanego genu. Schemat otrzymywania mutantów SCO i DCO przedstawiono na **Rycinie 4.1.**





Gotowy wektor do rekombinacji homologicznej wprowadzony metodą elektroporacji do komórek kompetentnych Mykobakterii



Rycina 4.2. Schemat poszukiwania mutantów SCO i DCO.

#### 4.23. Konstrukcja wektorów integracyjnych wykorzystywanych do komplementacji mutantów SCO

Konstrukcja wektora integracyjnego wykorzystanego do komplementacji mutantów SCO wymagała amplifikacji techniką PCR sekwencji badanego genu, a następnie wklonowanie go do wektora niosącego silny chemicznie indukowany

promotor (pKW08Lx). Kolejnym etapem było przeklonowanie genu wraz z promotorem do wektora integracyjnego (pKW08Lx-Int), który posiada zdolność integracji z genomowym DNA komórek mykobakterii. Ponadto wektor ten zawiera gen markerowy ułatwiający proces selekcji uzyskanych mutantów. Komplementację komórek mykobakterii rekombinowanym genem otrzymuje się w wyniku elektrotransformacji komórek mutantów SCO przygotowanym wektorem integracyjnym. Komórki mykobakterii, które wintegrowały wektor do swojego genomu, nabywają cech kodowanych przez geny obecne na plazmidzie. Umożliwia to poszukiwanie mutantów SCO z wintegrowanym do chromosomu rekombinowanym wektorem. Kolejny etap obejmuje dalszą rearanżację materiału genetycznego uzyskanych komplementowanych mutantów SCO i w konsekwencji otrzymanie warunkowych mutantów DCO.

#### **4.24. Hybrydyzacja metodą Southern Blot**

Genotyp mutantów SCO oraz DCO otrzymanych na drodze rekombinacji homologicznej potwierdzano metodą hybrydyzacji typu Southern Blot. Transfer potrawionego DNA z żelu na nylonową membranę zachodzący przy udziale siły kapilarnej tworzącej się podczas nasiąkania materiału ssącego buforem SSC, przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Sambrook i wsp. w 1989r. Etap znakowania sondy, prehybrydyzacji, hybrydyzacji oraz detekcji sygnału wykonano wykorzystując zestaw odczynników ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Biosciences) zgodnie z instrukcją producenta.

#### **4.25. Analiza cech fenotypowych komórek szczepów *Mycobacterium smegmatis* z wykorzystaniem macierzy fenotypowych firmy BIOLOG**

System BIOLOG pozwala na charakterystykę cech fenotypowych szczepów bakterii poprzez analizę ich metabolizmu. Metoda ta polega na wykorzystaniu komercyjnych 96-dołkowych płytek opłaszczonych antybiotykami lub innymi związkami chemicznymi. Na płytki te nanosi się zawiesinę komórek bakterii, a następnie monitoruje się ich wzrost. Charakterystyka cech fenotypowych szczepów jest określana na podstawie

kinetyki wzrostu komórek bakterii w różnych warunkach. Badanie cech fenotypowych komórek szczepów *Mycobacterium smegmatis* z wykorzystaniem macierzy fenotypowych firmy BIOLOG przeprowadziła dr Anna Żaczek, w Katedrze Biochemii i Biologii Komórki, Uniwersytetu Rzeszowskiego. Procedura przygotowania płytek macierzy fenotypowych została opisana przez Dadura i wsp. w 2017r. Do analizy wykorzystano komercyjne płytki PM11-PM20 zawierające 240 różnych związków chemicznych, które zaszczepiono dodając po 100  $\mu$ l zawiesiny komórek bakteryjnych. Zawiesinę bakteryjną uzyskiwano poprzez zawieszenie kolonii bakteryjnych w buforze (IF0a-BIOLOG) do transmitancji 81%, a następnie dodanie wskaźnika redoks w postaci fioletu tetrazoliowego (według protokołu PM BIOLOG). Szybkość redukcji fioletu tetrazoliowego do purpurowego formazanu jest proporcjonalna do intensywności oddychania bakterii. Oprogramowanie BIOLOG umożliwia rejestrowanie intensywności koloru purpurowego jako wartość i wykreślenie krzywej wzrostu dla szczepów w obecności danej substancji chemicznej [Dadura i wsp., 2017].

#### **4.26. Analiza wrażliwości komórek mykobakterii na wybrane antybiotyki z wykorzystaniem testu kropkowego**

Analizę wrażliwości na antybiotyki komórek *M. smegmatis* z wykorzystaniem testu kropkowego przeprowadzono według procedury opisanej przez Dadura i wsp. w 2017r. Komórki *M. smegmatis* w fazie logarytmicznego wzrostu rozcieńczono podłożem Middlebrook 7H9/OADC do gęstości optycznej  $OD_{600}=0,5$ . Następnie, wykonywano szereg rozcieńczeń w postępie geometrycznym. 10  $\mu$ l zawiesiny komórek z rozcieńczeń :  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  oraz  $10^{-4}$  nakropiono na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC zawierające różne stężenia badanych antybiotyków: apramycyna 0,1 – 0,7  $\mu$ g/ml, sisomycyna 0,5 – 2,0  $\mu$ g/ml, streptomycyna 0,3 – 2,0  $\mu$ g/ml, dihydrostreptomycyna 0,2 – 1,0  $\mu$ g/ml, kanamycyna 1,0 – 2,5  $\mu$ g/ml, tetracyklina 0,1 – 1,0  $\mu$ g/ml. Płytki ze szczepami *M. smegmatis* inkubowano w 37°C przez 3 - 5 dni i fotografowano [Dadura i wsp., 2017].

#### **4.27. Analiza przeżywalności komórek mykobakterii - CFU**

Przeżywalność komórek mykobakterii, hodowanych w podłożu płynnym zawierającym wybrane związki, wykonywano przy użyciu metody tworzenia jednostek koloniotwórczych CFU (*ang. colony forming unit*). Komórki *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis* z logarytmicznej fazy wzrostu rozcieńczono podłożem Middlebrook 7H9/OADC/Tween-80 do OD<sub>600</sub> równego 0,1. Następnie, do hodowli dodawano związki. W przypadku *M. smegmatis* były to: menadion - 150 µM, DETA/NO - 1000 µM, apramycyna - 0,55 µg/ml, sisomycyna - 2,3 µg/ml, streptomycyna - 0,5 µg/ml, dihydrostreptomycyna - 0,5 µg/ml, kanamycyna - 2 µg/ml, tetracyklina - 0,1 µg/ml. Natomiast w przypadku *M. tuberculosis*: menadion - 10 µM, DETA/NO - 25 µM. Hodowle szczepów *M. smegmatis* prowadzono przez 24 godziny w 37 °C, natomiast *M. tuberculosis* prowadzono przez 11 dni. Z fazy logarytmicznego wzrostu jak i fazy stacjonarnej eksperymentów pobrano komórki, wykonano 10-krotne seryjne rozcieńczenia i wysiano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC. Płytki inkubowano w 37 °C przez 3 - 5 dni (*M. smegmatis*) lub 14-21 dni (*M. tuberculosis*), a po inkubacji kolonie zliczono.

#### **4.28. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost badanych szczepów w obecności wybranych antybiotyków**

W celu określenia wartości MIC dla testowanych antybiotyków, zastosowano mikroplótkowy test Alamar blue (test MABA) opisany przez Franzblauma i wsp. w 1998 roku z niewielkimi modyfikacjami [Franzblaum i wsp., 1998]. Test wykonano na płytkach 96 dołkowych, na których przygotowano rozcieńczenia antybiotyków w pożywce bakteryjnej (7H9/OADC). Następnie do rozcieńczeń antybiotyków dodano po 100 µl zawiesiny bakterii (rozcieńczonej 100 krotnie ze zmętnienia równego 0,5 w skali McFarlanda). Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C do płytek dodano 25 µl roztworu Alamar blue (Invitrogen), po czym płytki inkubowano przez kolejne 24 godziny. Zmiana koloru z niebieskiego na różowy świadczy o redukcji wskaźnika redoks (resazuryny) przez komórki bakteryjne. Do testu MABA użyto antybiotyki o następującym

zakresie stężeń: kanamycyna (0,09375 – 12 µg/ml), streptomycyna (0,0078125 – 10 µg/ml), dihydrostreptomycyna (0,0078125 – 10 µg/ml), apramycyna (0,0078125 – 10 µg/ml), sisomycyna (0,125 – 16 µg/ml), tetracyklina (0,03125 – 4 µg/ml), izoniazyd (3,9 – 500 µg/ml), ryfampicyna (0,0078125 – 10 µg/ml), etambutol (0,125 – 16 µg/ml), ofloksacyna (0,0078125 – 1 µg/ml), etionamid (3,123 – 400 µg/ml), kapreomycyna (0,78 – 100 µg/ml) [Wiegandetal i wsp., 2008; Daura i wsp., 2017]. Analizę wrażliwości szczepów *M. smegmatis* na izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej wykonano analogicznie, jednakże zawiesina bakterii dodawana do szeregu rozcieńczeń izoniazydu (3,9 – 500 µg/ml) zawierała dodatkowo: reserpinę (30 µg) lub walinomycynę (1 µg) lub werapamil (15 µg).

#### **4.29. Analiza wnikania streptomycyny do komórek *Mycobacterium smegmatis***

Analizę wnikania streptomycyny do komórek *Mycobacterium smegmatis* przeprowadzono we współpracy z dr hab. Bożeną Dziadek, prof. UŁ z Zakładu Parazytologii Uniwersytetu Łódzkiego, według procedury opisanej przez Dadura i wsp. w 2017r. Do 20 ml zawiesiny komórek (wyhodowanych w podłożu Middlebrook 7H9/OADC z dodatkiem Tween-80 do OD<sub>600</sub> równego 0,5) dodano streptomycynę (0,7 µg/ml) i inkubowano przez 60 i 180 minut. Po inkubacji z antybiotykiem prątki wirowano, przemywano podłożem a następnie dwukrotnie rozbijano kulkami cyrkoniowymi z wykorzystaniem urządzenia firmy MP Biomedicals z adapterem Quick prep (45 s, 6,0 m/s). Wnikanie streptomycyny do komórek mykobakterii monitorowano przy użyciu komercyjnego zestawu immunoenzymatycznego Green Spring Streptomycin ELISA test Kit (Antibodies-online) [Daura i wsp., 2017].

#### **4.30. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Alamar Blue**

Test redukcji resazuryiny przez komórki mykobakterii (mikroplótkowy test Alamar Blue) wykorzystano w badaniach aktywności oddechowej komórek *M. smegmatis*. Procedurę przeprowadzono według protokołu opisanego przez Dadura i wsp. w 2017r.

Do studzienek 96 dołkowej płaskodennej płytki dodano po 200 µl zawiesiny bakterii o gęstości  $1 \times 10^6$  komórek/ml oraz po 25 µl odczynnika Alamar Blue. Całość inkubowano w temperaturze 37°C w komorze wilgotnej przez 11 godzin. W odpowiednich punktach czasowych eksperymentu (0, 7, 11 godzina) dokonano pomiaru gęstości optycznej, przy długości fali 570 nm i 600 nm, z wykorzystaniem spektrofotometru Benchmark Plus Microplate firmy BioRad [Daura i wsp., 2017].

#### **4.31. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem chlorku 2,3,5-trifenylotetrazoliowego (TTC)**

Test redukcji chlorku 2,3,5-trifenylotetrazoliowego (TTC), do czerwonego formazanu, wykorzystano w badaniach aktywności oddechowej komórek *M. smegmatis*. Procedurę przeprowadzono według protokołu opisanego przez Dadura i wsp. w 2017r. Do studzienek 96 dołkowej płaskodennej płytki dodano po 200 µl zawiesiny bakterii o gęstości  $1 \times 10^6$  komórek/ml oraz roztwór TTC uzyskując końcowe stężenie związku wynoszące 0,625 mg/ml. Płytkę inkubowano w temperaturze 37 °C przez 7 godzin. W odpowiednich punktach czasowych eksperymentu (0, 2, 7 godzina) dokonano pomiaru gęstości optycznej, przy długości fali 480 nm, z wykorzystaniem spektrofotometru Benchmark Plus Microplate firmy BioRad [Daura i wsp., 2017].

#### **4.32. Izolacja RNA z komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis***

Całkowity RNA został wyizolowany z komórek badanych szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* zgodnie z protokołem opisanym przez Pawelczyk i wsp. w 2011r. Komórki z fazy logarytmicznego wzrostu (15 ml hodowli) zwirowano, a następnie osad komórek zawieszono w 300 µl wody DEPC i 900 µl Trizol LS (Invitrogen) i rozbito dwukrotnie kulkami krzemionkowymi 0,1 mm (MP Biomedicals) stosując aparat MP Disruptor z adapterem Quick prep adapter (MP Biomedicals). Kończącym etapem było usunięcie zanieczyszczeń DNA. W tym celu zastosowano DNAzę I (Invitrogen), procedurę wykonano zgodnie z instrukcją producenta [Pawelczyk i wsp., 2011].

### 4.33. Globalna analiza transkryptomu

Globalną analizę transkryptomu (RNA-Seq) przeprowadzono dla szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*. Pierwszym etapem procedury było oczyszczenie badanych próbek RNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych AMPure XP (Beckman Coulter). W tym celu do próbek RNA dodano dwukrotną objętość kulek magnetycznych i po 15 minutach inkubacji (temperatura pokojowa) kulki oddzielano na separatorze magnetycznym, a supernatant usunięto. Następnie kulki płukano dwukrotnie 200 µl 70% etanolu. Kulki ze związanym RNA suszono w temperaturze pokojowej, zawieszono w 13,5 µl wody DEPC i po 2 minutach inkubacji oddzielono supernatant zawierający oczyszczone RNA. Następnie usunięto rRNA z badanych próbek RNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina) zgodnie z zaleceniami producenta. Następnym etapem procedury było przygotowanie bibliotek RNA z użyciem komercyjnego zestawu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS), zgodnie z zaleceniami producenta. W kolejnym kroku, z wykorzystaniem odpowiednich oligonukleotydów, bibliotekom przyporządkowano 6-nukleotydowe indeksy. Jakość oraz ilość bibliotek określano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Agilent DNA 1000 Kit (Agilent) oraz aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Molarność bibliotek sprawdzano natomiast z wykorzystaniem komercyjnego zestawu NEBNext Library Quant Kit for Illumina (New England Biolabs). Uzyskane biblioteki zostały zsekwencjonowane z wykorzystaniem urządzenia NextSeq 500 firmy Illumina w ramach współpracy z Katedrą Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego przez dr Dominika Strapagiela. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania RNA została wykonana przez dr Przemysława Płocińskiego w Instytucie Biologii Medycznej PAN.

### 4.34. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern

Hybrydyzację typu Northern (*ang. northern blot*) zastosowano do ilościowej oceny cząsteczek dojrzałych oraz prekursorowych rybosomalnego RNA w badanych szczepach *M. smegmatis* według protokołu opisanego przez Dadura i wsp. w 2017r. 2 µg

całkowitego RNA rozdzielono w 1,2% denaturującym żelu agarozowym zawierającym formaldehyd (0.9%), wykorzystując bufor NBC (**Materiały 3.8.4**) [Szczęsny i wsp., 2010]. Następnie przeniesiono RNA z żelu na membranę nylonową Hybond+ wykorzystując transfer kapilarny, prowadzony przez noc w buforze 20xSSC (**Materiały 3.8.2**). Membranę utrwalono w świetle UV o długości fali 260 nm i hybrydyzowano z sondami oligonukleotydowymi o długości 20–25 pz znakowanymi  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, komplementarnymi do testowanego transkryptu. Po płukaniu membrany w celu usunięcia niespecyficznie związanych elementów, sygnał transferowano przez 1 godzinę na ekran do obrazowania. W celu wizualizacji wyników, ekran skanowano przy użyciu aparatu Typhoon 8600 Imager Scanner firmy GE Healthcare [Daura i wsp., 2017].

#### **4.35. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qRT - PCR)**

Metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT - PCR) analizowano poziomy transkryptów genów 16S, 23S i 5S wykorzystując próbki RNA, które wykorzystano uprzednio do hybrydyzacji typu Northern. 1  $\mu$ g całkowitego RNA poddano odwrotnej transkrypcji, stosując oligonukleotydy komplementarne do badanych genów i komercyjny zestaw SuperScript III FirstStrand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Analizę poziomu ekspresji genów 16S, 23S i 5S metodą qRT-PCR przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Pawelczyk i wsp. 2011r stosując odczynnik Maxima SYBR green qPCR master mix (Life Technologies) zgodnie z instrukcją producenta. Reakcję qRT-PCR prowadzono w urządzeniu 7900HT real time PCR system (Applied Biosystems) według protokołu składającego się z: początkowej denaturacji w 95°C przez 10 minut, 40 cykli denaturacji (95°C, 15 s), przyłączania starterów (56°C, 30 s) oraz wydłużania transkryptu (72°C, 30 s). Dla każdej reakcji PCR wykonywano analizę krzywej topnienia, aby sprawdzić jednorodność powstałych produktów PCR. Uzyskane wyniki odnoszono do krzywej standardowej poziomu ekspresji genów kodujących 16S, 23S i 5S [Pawelczyk i wsp., 2011 ; Gagala i wsp., 2014]



#### 4.36. Analiza rybosomów *M. smegmatis*

Analizę rybosomów *M. smegmatis* wykonano według protokołu opisanego przez Dadura i wsp. w 2017r. Komórki badanych szczepów *Mycobacterium smegmatis*, w fazie logarytmicznego wzrostu, hodowane w podłożu Middlebrook 7H9/OADC z dodatkiem Tweenu-80 o objętości 250 ml, zwirowano (4500 rpm, 4°C, 20 minut) a osad zawieszano w buforze do lizy (**Materiały 3.8.6.**). Komórki rozbijano dwukrotnie (45s, 6m/s) z 5-minutowymi przerwami na lodzie przy użyciu kulek krzemionkowych 0,1 mm (MP Biomedicals), stosując aparat MP Disruptor z adapterem Quick prep adapter (MP Biomedicals). Lizat komórkowy oczyszczono przez odwirowanie (14 000 rpm, 20 minut) i przepuszczenie przez filtr strzykawkowy (0,22 µm - Millipore). Tak oczyszczony lizat nakładano na świeżo przygotowany gradient sacharozy 7 - 47% [Esposito i wsp., 2010]. Całość wirowano przy prędkości 39,000 rpm przez 2 godziny z wykorzystaniem wirówki ThermoSorvallWX90 z i rotora TH641. Gradienty zbierano z wykorzystaniem systemu AKTA Purifier (GE Healthcare) wyposażonego w monitor UV, który rejestrował spektra dla rybosomu badanych prób [Daura i wsp., 2017].

#### 4.37. Analiza proteomiczna rybosomów *M. smegmatis*

W celu proteomicznej analizy rybosomów *M. smegmatis* frakcje zawierające podjednostki rybosomu precypitowano PRM (czerwień pirogalolowa *ang. acidified pyrogallol red*), a następnie rozdzielono w 12 % żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Frakcje równolegle analizowano za pomocą spektrometrii mas (MS / MS). Analizę MS przeprowadzono w ramach komercyjnej usługi w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie z wykorzystaniem aparatu Orbitrap Velos (Life Technologies), zgodnie z procedurą opisaną przez Plocinski i wsp. w 2014r. Badane preparaty białkowe zredukowano za pomocą DTT, alkirowano przy użyciu jodoacetamidu i poddano trawieniu trypsyną. Przygotowane w ten sposób próbki nałożono na wstępną kolumnę RP-18, a następnie przeniesiono na kolumnę nano-HPLC RP-18. System HPLC był bezpośrednio podłączony do systemu Orbitrap Velos. Otrzymane

wyniki zostały następnie przetworzone z wykorzystaniem oprogramowania MaxQuant [Plocinski i wsp., 2014].

#### **4.38. Badanie aktywności $\beta$ - galaktozydazy**

W badaniach aktywności  $\beta$ - galaktozydazy wykorzystano szczepy *M. smegmatis*, zawierające plazmid integracyjny niosący gen *lacZ* pod kontrolą promotora acetamidowego. Komórki z fazy logarytmicznego wzrostu (1 ml), hodowane w podłożu 7H9/OADC/Tween-80 z dodatkiem antybiotyków (streptomycyną 0,7  $\mu\text{g/ml}$ , dihydrostreptomycyną 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , tetracykliną 0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), rozbito dwukrotnie kulkami cyrkoniowymi 0,1 mm (2×45 s, 6.0 m/s), stosując aparat MP Disruptor z adapterem Quick prep firmy MP Biomedicals, zwirowano (5 min, 14000 rpm, temperatura pokojowa), a supernatant wykorzystano do analizy aktywności  $\beta$ - galaktozydazy zgodnie z protokołem opisanym przez Karimova i wsp. w 2000 r. Do supernatantu dodano bufor PM2 (**Materiały 3.8.3**), a reakcję zainicjowano przez dodatek 0,4% o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozydu (ONPG) i inkubowano w 28°C przez 20 min. Reakcję stopowano przez dodatek węgla sodu do końcowego stężenia 0,5 M, a absorbancję mierzono przy długości fali równej 420 nm. Aktywność enzymatyczną prób obliczono w odniesieniu do OD<sub>600</sub> każdej badanej hodowli [Karimova i wsp., 2000].

#### **4.39. Badanie aktywności katalazy**

Badane szczepy *M. smegmatis* hodowano do fazy logarytmicznego wzrostu, a następnie po 5 ml hodowli z każdej badanej próby zwirowano (4500 rpm, 4°C, 20 minut). Powstały osad zawieszono w 1 ml buforu PB, dodano kulki cyrkoniowe 0,1 mm (BioSpec Products) i rozbito stosując aparat MP Disruptor z adapterem Quick prep adapter firmy MP Biomedicals (2 × 45 s, 6.0 m/s). Próby następnie zwirowano (25000 g, 4°C, 30 minut), a powstały lizat przeniesiono do nowej probówki. Stężenie białka w badanych lizatach oznaczono z wykorzystaniem urządzenia DS-11 FX firmy DeNovix. Zmieszano 330  $\mu\text{l}$  lizatu, 330  $\mu\text{l}$  buforu PB oraz 330  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (roztwór 10 mM) i mierzono

absorbancję prób, w czasie 0, 1 i 2 minut, przy długości fali 240 nm z wykorzystaniem urządzenia DS-11 FX firmy DeNovix. Aktywność katalazy obliczano ze wzoru:

$$U/mg = \frac{(A_0 - A_{60}) \times V_t}{\epsilon_{240} \times d \times V_s \times C_t \times 0,001}$$

Gdzie:

$(A_0 - A_{60})$  – różnica pomiędzy początkową i końcową absorbancją próby

$V_t$  – końcowa objętość reakcji

$\epsilon_{240}$  – molowy współczynnik absorpcji dla  $H_2O_2$  przy  $OD_{240}$  (34.9 mol/cm)

$d$  – długość ścieżki optycznej dla kuwety (1cm)

$V_s$  – objętość próbki w ml

$C_t$  – stężenie białka w próbce mg/ml.

#### **4.40. Analiza statystyczna**

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu Sigma Plot 12.0

## 5. Wyniki

### 5.1. Pdtas jako kinaza histydynowa jest zdolne do fosforylacji białka partnerskiego Pdtar

#### 5.1.1. Charakterystyka białek dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału Pdtas/Pdtar

Kinaza histydynowa Pdtas zbudowana jest z 501 aminokwasów, jej masa cząsteczkowa wynosi 54012,5 Da, a punkt izoelektryczny 5,5788. Homologiem białka Pdtas *M. tuberculosis* jest m.in. białko MSMEG\_1918 (*M. smegmatis*). Analizy in silico pozwoliły na identyfikację w białku Pdtas domen: H\_kinase\_N, HisKA\_2, HWE\_HK, HATPase\_c, HATPase\_c\_2, PAS\_4. Domena H\_kinase\_N ma około 150 aminokwasów długości. Domeny należące do tej rodziny są opisywane głównie jako kinazy histydynowe zaangażowane w transdukcję sygnału. Domena PAS\_4 to domena sygnałowa. Jest zdolna do wykrywania tlenu, potencjału redoks, światła i innych bodźców środowiskowych. Jednym ze sposobów, w jaki białka prokariotyczne PAS odbierają bodźce środowiskowe, jest wykrywanie zmian w systemie transportu elektronów. Służy to jako system wczesnego ostrzeżenia przed obniżeniem poziomu energii komórkowej. HisKA\_2 jest domeną dimeryzacji i fosfoakceptora podrodziny kinaz histydynowych. Domena HWE\_HK należy do kinaz systemu dwuskładnikowego. Posiada wysoce konserwowaną histydynę i motyw WxE w C-końcowej domenie ATPazy. Domeny HATPase\_c oraz HATPase\_c\_2 znajdują się w białkach wiążących ATP, np: kinazach histydynowych, gyrazie DNA B, topoizomerazie, białku szoku termicznego HSP90 [GenomeNet database; Pfam database].

Regulator odpowiedzi Pdtar (Rv1626) zbudowany jest z 205 aminokwasów, jego masa cząsteczkowa wynosi 22669,2 Da, a punkt izoelektryczny równy 4,7423. Homologiem białka Pdtar *M. tuberculosis* jest m.in. białko MSMEG\_3246 (*M. smegmatis*). W białku Pdtar identyfikuje się domeny: Response\_reg, ANtar, RE\_XamI. Domena Response\_reg jest odpowiedzialna za odbiór sygnału od sensorowego partnera w bakteryjnych systemach dwuskładnikowych. Domena RE\_XamI należy do restrykcyjnych endonukleaz, rozpoznaje sekwencję GTCGAC, ale miejsce cięcia pozostaje dotąd

niepoznane. Domena ANтар ma zdolność wiązania RNA. Znajduje się w takich białkach regulatorowych jak AmiR i NasR pełniąc rolę antyterminatora transkrypcji [GenomeNet Database; Pfam database; Ramesh i wsp., 2012].

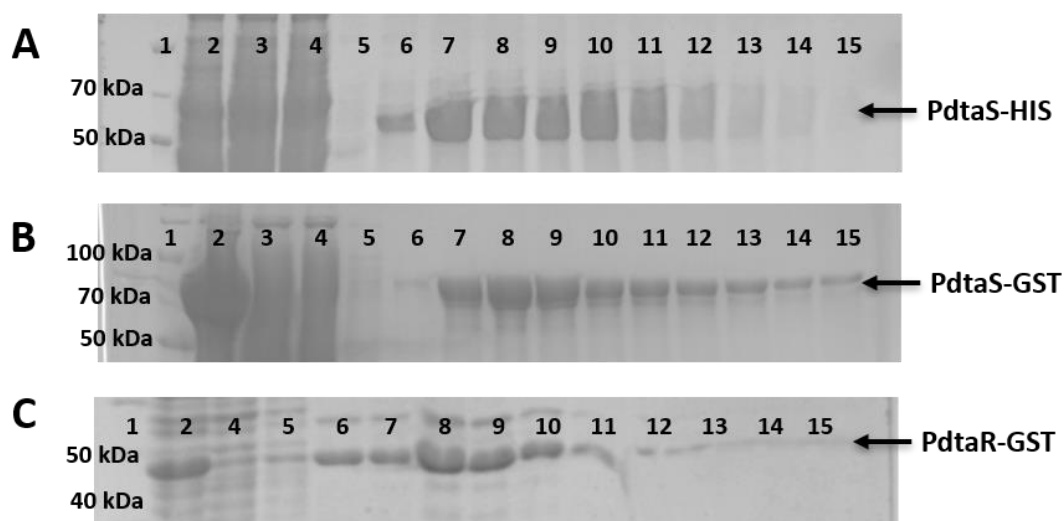
### 5.1.2. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych zdolnych do nadprodukcji rekombinowanego białka PdtaS i PdtaR

Do uzyskania nadprodukcji rekombinowanych białek wykorzystano wektory pozwalające na indukowaną ekspresję białek w komórkach *E. coli* lub *M. smegmatis*. Rekombinowane białka PdtaS<sub>Mtb</sub> oraz PdtaR<sub>Mtb</sub> w fuzji z GST uzyskiwano z wykorzystaniem wektora pGEX-6P-2 w komórkach *E. coli* BL21, natomiast białko PdtaS<sub>Mtb</sub> w fuzji z 6-His uzyskiwano z wykorzystaniem wektora pJAM2 w komórkach *M. smegmatis*. Procedurę szczegółowo opisano w rozdziale **Metody 4.15**. Przygotowanie wektorów obejmowało amplifikację genów *pdtaS<sub>Mtb</sub>* oraz *pdtaR<sub>Mtb</sub>* na matrycy genomowego DNA *M. tuberculosis* wykorzystując odpowiednie oligonukleotydy (**Tabela 3.4.**). Produkt powstały po amplifikacji klonowano do wektora pJET 1.2 (weryfikacja poprzez sekwencjonowanie), a następnie wycięto z użyciem odpowiednich endonukleaz. Gen *pdtaS<sub>Mtb</sub>* wycięto endonukleazami i przeklonowano do odpowiednich wektorów: BamHI i XbaI (do pJAM2) lub BamHI i NotI (do pGEX-6P-2), natomiast gen *pdtaR<sub>Mtb</sub>* wycięto z wykorzystaniem BamHI i EcoRI (do pGEX-6P-2). Powstałe konstrukty nazwano następująco: pKD6 (pJAM2 niosący gen *pdtaS<sub>Mtb</sub>*), pKD7 (pGEX-6P-2 niosący gen *pdtaS<sub>Mtb</sub>*), pKD8 (pGEX-6P-2 niosący gen *pdtaR<sub>Mtb</sub>*). Skonstruowany plazmid pKD6 wprowadzano do komórek *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, natomiast plazmidy pKD7 oraz pKD8 do komórek *E. coli* BL21.

### 5.1.3. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek PdtaS i PdtaR

Nadprodukcję oraz oczyszczanie białek PdtaS<sub>Mtb</sub>-GST, PdtaS<sub>Mtb</sub>-HIS, PdtaR<sub>Mtb</sub>-GST z wykorzystaniem kolumnowej chromatografii powinowactwa opisano w rozdziałach **Metody 4.16. oraz 4.17**. Rekombinowane białka w fuzji z S-transferazą glutationową (GST) oczyszczano metodą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem kolumn zawierających agarozę glutationową (Pierce). Natomiast, rekombinowane białko ze znacznikiem HIS oczyszczono z wykorzystaniem kolumn zawierających złożę Ni-NTA. Frakcje zawierające roztwory białek, pobierane na różnych etapach oczyszczania,

rozdzielono w żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem elektroforezy pionowej SDS-PAGE (**Rycina 5.1.**).



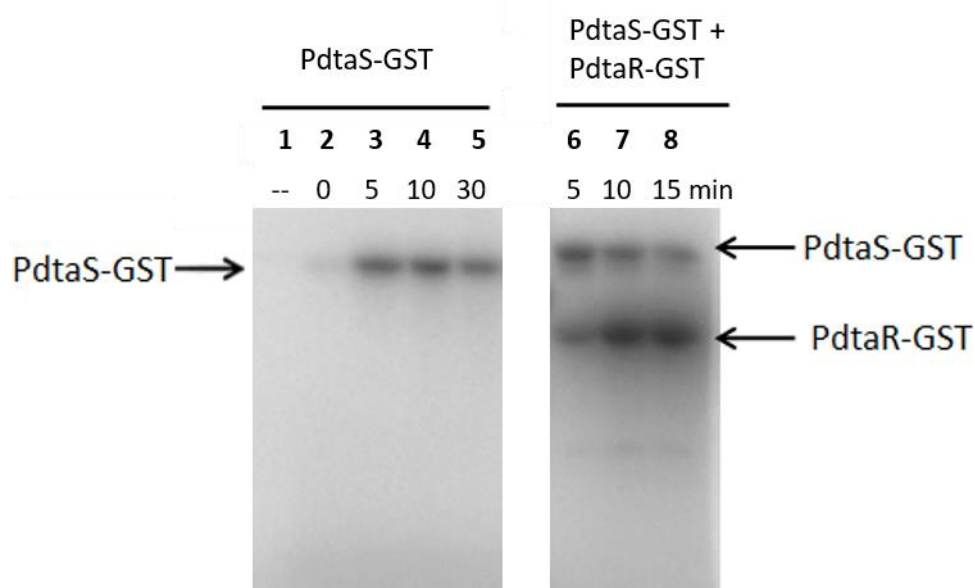
**Rycina 5.1.** Analiza SDS-PAGE frakcji po oczyszczaniu białek (**A**) PdtaS<sub>Mtb</sub>-HIS, (**B**) PdtaS<sub>Mtb</sub>-GST, (**C**) PdtaR<sub>Mtb</sub>-GST. (1) Marker wielkości białek, (2) Całkowite białko w biomacie, (3) Supernatant przed nałożeniem na kolumnę, (4) Supernatant po kolumnie, (5) Frakcja po płukaniu kolumny, (6 – 15) Elucje

W wyniku oczyszczania i zateżenia białek otrzymano preparaty białkowe o następujących stężeniach: PdtaS<sub>Mtb</sub>-HIS (1 mg/ml), PdtaS<sub>Mtb</sub>-GST (0,73 mg/ml), PdtaR<sub>Mtb</sub>-GST (7,3 mg/ml). Zateżenie białek i określanie ich stężenia metodą BCA opisano w rozdziale **Metody 4.17.**

#### 5.1.4. Autofosforylacja kinazy histydynowej PdtaS i fosfotransfer do regulatora odpowiedzi PdtaR

Zgodnie z danymi literaturowymi, białko PdtaS jest elementem dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału PdtaS/PdtaR. Białko PdtaS jest zdolne do autofosforylacji i przekazania reszty fosforanowej do regulatora odpowiedzi PdtaR [Ghosh i wsp., 2013]. Aby zweryfikować te dane oraz zbadać czy uzyskano rekombinowane białko w formie aktywnej wykonano test autofosforylacji białka PdtaS i fosfotransferu do białka PdtaR (**Rycina 5.2**). Procedurę wykonano według instrukcji

opisanej w rozdziale **Metody 4.20**. Wynik eksperymentu potwierdził zdolność białka PdtaS do autofosforylacji i przekazania reszty fosforanowej do białka regulatorowego PdtaR.



**Rycina 5.2.** Autofosforylacja i fosfotransfer białka PdtaS. **(1-5)** Autofosforylacja białka PdtaS-GST (2,5  $\mu$ M) w buforze PB i obecności jonów wapnia i magnezu. Reakcję inicjowano przez dodatek  $^{32}$ P-ATP. **(6-8)** Reakcja fosfotransferu z wykorzystaniem 2,5  $\mu$ M białka PdtaS-GST w buforze PB i obecności jonów wapnia i magnezu. Autofosforylację białka PdtaS-GST inicjowano przez dodatek  $^{32}$ P-ATP, inkubowano i użyto do reakcji fosfotransferu z 4  $\mu$ M PdtaR-GST.

## 5.2. Funkcjonalny gen *pdtaS* nie jest niezbędny do wzrostu i przeżycia komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*

### 5.2.1. Konstrukcja wektorów plazmidowych użytych podczas rekombinacji homologicznej

Gen *pdtaS* (*rv3220c*) został opisany przez Parish i wsp. w 2003 roku jako gen, który nie jest niezbędny do przeżycia *M. tuberculosis* [Parish i wsp., 2003]. Aby ocenić rolę sensorowej kinazy PdtaS u mykobakterii, wykorzystując dwuetapowy protokół do rekombinacji homologicznej, skonstruowano rekombinowane szczepy *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* z delecją w genie *pdtaS*. Procedurę opisano w rozdziale **Metody 4.20** oraz **4.23**.

Wektory p2NIL użyte do rekombinacji homologicznej niosły sekwencję powyżej genu 5'*pdtaS* (Ms1136 pz, Mtb1797 pz) i pierwsze 79 albo 109 pz (odpowiednio dla *Ms* oraz *Mtb*,) genu *pdtaS* połączone z sekwencją poniżej genu 3'*pdtaS* (Ms807 pz, Mtb612 pz), poprzedzone przez 448 pz lub 943 pz (odpowiednio dla *Ms* i *Mtb*,) końcowego regionu genu *pdtaS*. Powstały gen  $\Delta$ *pdtaS* kodował krótki, niefunkcjonalny peptyd. Kończącym etapem było wklonowanie do powstałych rekombinowanych wektorów p2NIL kasyety markerowej Pacl pochodzącej z wektora pGOAL17, uzyskując w ten sposób wektory użyte w procesie rekombinacji homologicznej (pKD5, pMK224, niosące gen  $\Delta$ *pdtaS*<sub>Ms</sub> albo  $\Delta$ *pdtaS*<sub>Mtb</sub>). Listy skonstruowanych podczas pracy plazmidów oraz wykorzystanych syntetycznych oligonukleotydów znajdują się w **Tabelach 3.3, 3.4**.

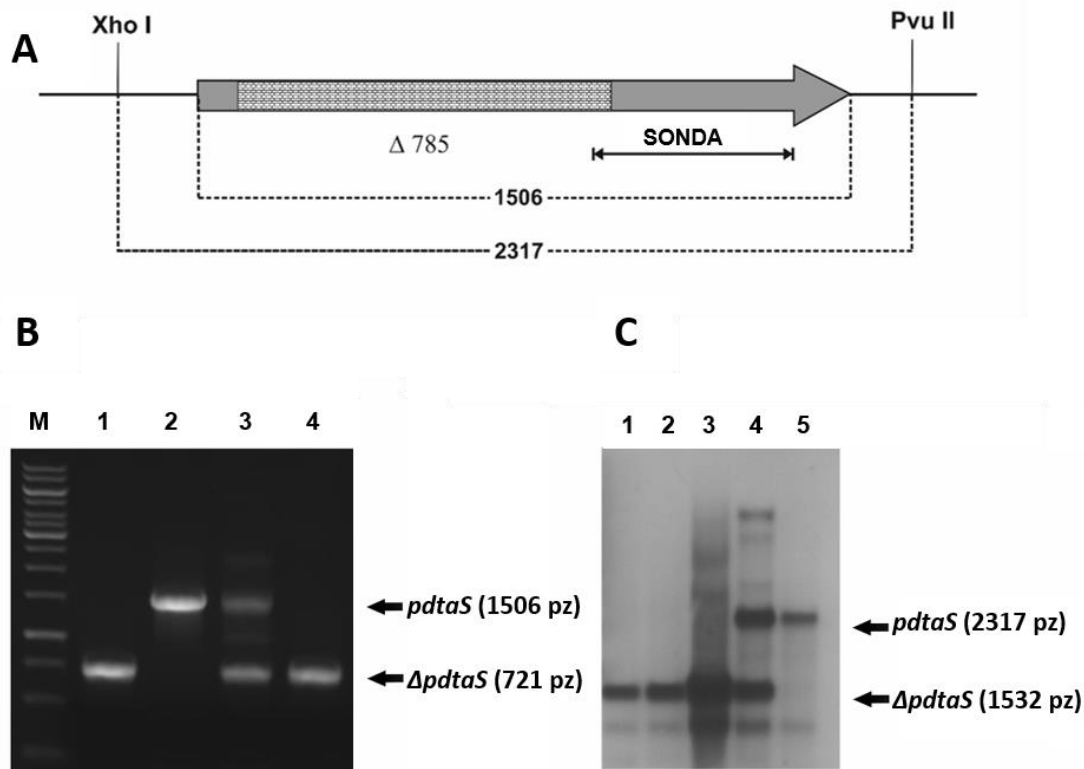
Konstrukcja wektora komplementacyjnego obejmowała amplifikację metodą PCR genu *pdtaS* (stosując oligonukleotydy wymienione w **Tabeli 3.4**) i wklonowanie w miejsce BamHI-HindIII do wektora pKW08Lx poniżej promotora P<sub>tet</sub>. Następnie gen i promotor P<sub>tet</sub> wycięto z powstałego wektora (pKL5) za pomocą enzymów restrykcyjnych HindIII i XbaI i wklonowano do wektora integracyjnego pKW08Lx-Int, generując plazmid pKD10.

### **5.2.2. Pozbawienie komórek *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* funkcjonalnego genu *pdtaS***

Dwuetapową rekombinację homologiczną przeprowadzono według protokołu opisanego przez Parish i wsp. w 2000 roku [Parish i wsp., 2000]. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.21.** oraz **4.22.**

Plazmidowy DNA pKD10 oraz pMK224 zintegrowano z genomem bakteryjnym odpowiednio *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. W pierwszym etapie otrzymano pojedyncze krzyżowe rekombinanty SCO niosące zarówno gen *pdtaS* typu dzikiego jak i  $\Delta$ *pdtaS* z wewnętrzną delecją (zweryfikowane metodą PCR i Southern blot). Następnie, zgodnie z protokołem poszukiwano podwójnych krzyżowych rekombinantów (DCO). Genotyp szczepu  $\Delta$ *pdtaS* *M. tuberculosis* potwierdzono metodami PCR oraz hybrydyzacji typu Southern (**Rycina 5.3**).

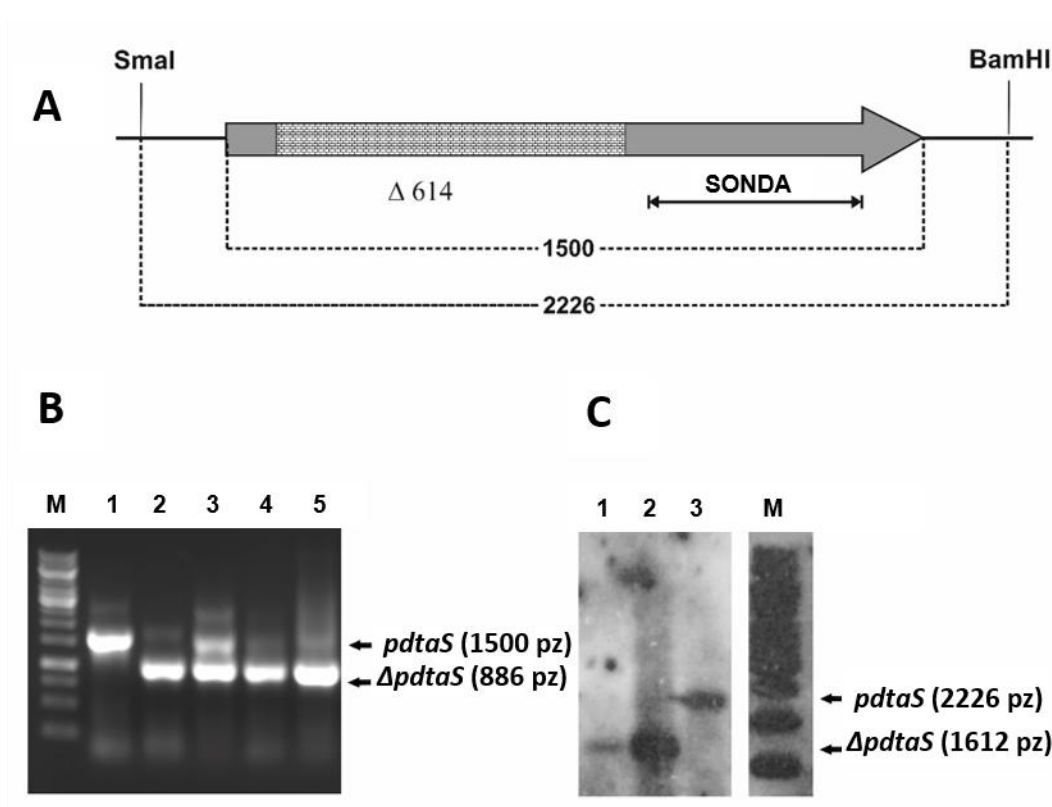




**Rycina 5.3.** Potwierdzenie genotypu mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis*. **(A)** Schemat przedstawiający fragment DNA trawiony restrykcyjnie (2317 pz) i wielkość wewnętrznej delecji w zmutowanym genie (785 pz). **(B)** PCR potwierdzający delecję w obrębie genu *pdtaS*. M - marker wielkości DNA, 1-pMK223 plazmid, 2- szczep typu „dzikiego”, 3-SCO, 4-DCO1. **(C)** Hybrydyzacja typu Southern potwierdzająca delecję w obrębie genu *pdtaS*. 1-DCO1, 2- DCO2, 3-DCO3, 4- SCO, 5- szczep typu „dzikiego”.

Liczne próby skonstruowania zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* zakończyły się niepowodzeniem, dlatego skonstruowano mutantu warunkowego SCO z wintegrowanym w miejsce *attB* genomu wektorem pKW08Lx-Int niosącym funkcjonalną kopię genu *pdtaS*, znajdującą się pod kontrolą tetracyklinowego promotora (pKD10). Szczep ten poddano następnie rekombinacji homologicznej w celu wygenerowania szczepu DCO pozbawionego natywnego genu *pdtaS*. Uzyskany rekombinowany szczep  $\Delta pdtaS$ -*pdtaS* *M. smegmatis* zawierał jedyną komplementacyjną kopię genu *pdtaS* znajdującą się w obrębie plazmidu pKD10 zintegrowaną w miejscu *attB* chromosomalnego DNA. Następnie z wykorzystaniem miejscowo-specyficznej

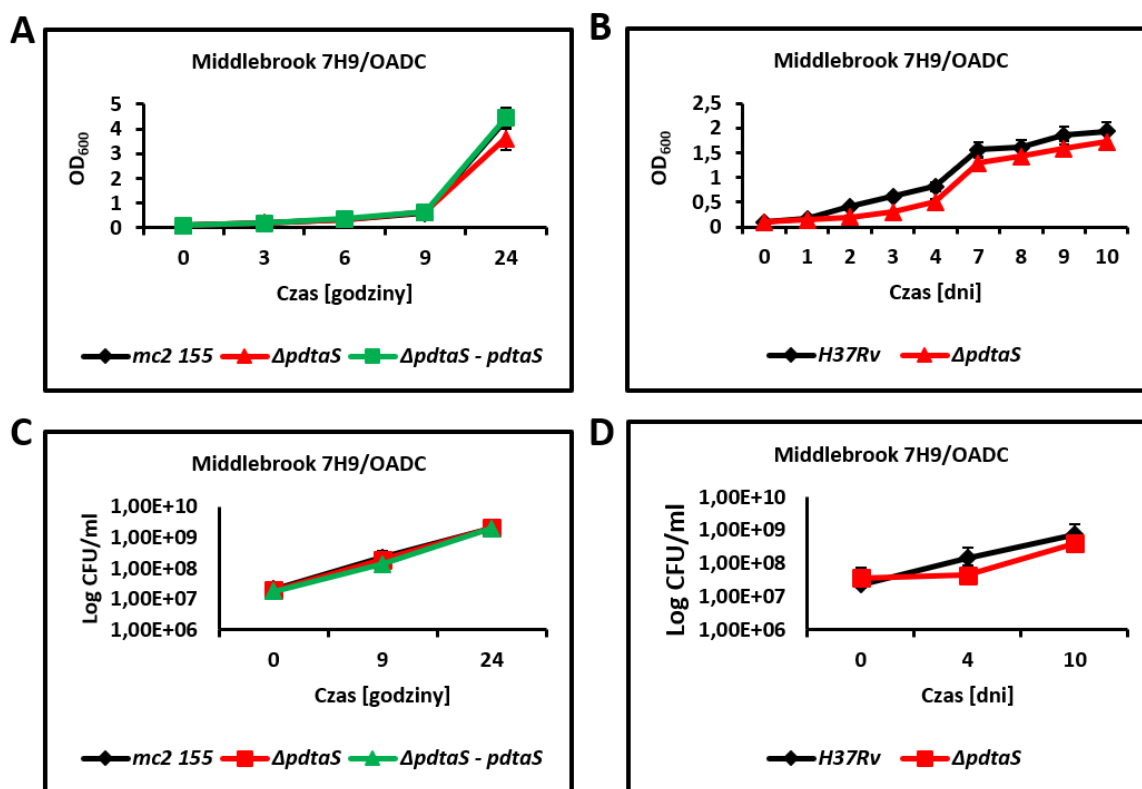
rekombinacji plazmid pKD10 zastąpiono „pustym” wektorem pMV306K, który ostatecznie utracono przez hodowanie bakterii bez presji antybiotykowej. Genotyp zmutowanego szczepu *ΔpdtaS M. smegmatis* został potwierdzony metodą PCR oraz metodą hybrydyzacji typu Southern (**Rycina 5.4**). Sondy do hybrydyzacji z genem *pdtaS* uzyskano wykorzystując metodę PCR, a następnie znakując otrzymany produkt z wykorzystaniem komercyjnego zestawu DIG-labeling system. Syntetyczne oligonukleotydy zastosowane do amplifikacji DNA oraz do zsyntetyzowania sond hybrydyzacyjnych zostały zamieszczone w **Tabeli 3.3**.



**Rycina 5.4.** Potwierdzenie genotypu mutantu *ΔpdtaS M. smegmatis*. **(A)** Schemat przedstawiający fragment DNA trawiony restrykcyjnie (2226 pz) i wielkość wewnętrznej delecji w zmutowanym genie (614 pz). **(B)** PCR potwierdzający delecję w obrębie genu *pdtaS*. M – marker wielkości DNA, 1- szczep typu „dzikiego”, 2- pKD4 plazmid, 3-SCO, 4-DCO1, 5-DCO2. **(C)** Hybrydyzacja typu Southern potwierdzająca delecję w obrębie genu *pdtaS*. 1-DCO1, 2- DCO2, 3- szczep typu „dzikiego”, M- marker wielkości DNA.

### 5.2.3. Analiza tempa wzrostu i przeżywalności szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtA*S

Aby zweryfikować czy brak funkcjonalnego genu *pdtA*S wpływa na kinetykę wzrostu lub przeżywalność komórek *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, dokonano analizy tempa wzrostu przez pomiar gęstości optycznej hodowli oraz analizy przeżywalności komórek metodą CFU, hodowanych w standardowym podłożu Middlebrook 7H9/OADC. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.27**. Analizy przeżywalności jak również kinetyki wzrostu, dla komórek zmutowanego szczepu  $\Delta pdtA$ S *M. smegmatis* lub  $\Delta pdtA$ S *M. tuberculosis* nie wykazały istotnych statystycznie różnic w porównaniu do komórek szczepu kontrolnego mc<sup>2</sup>155 *M. smegmatis* lub H37Rv *M. tuberculosis* (**Rycina 5.5**). Eksperyment przeprowadzono w trzech biologicznych powtórzeniach a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.



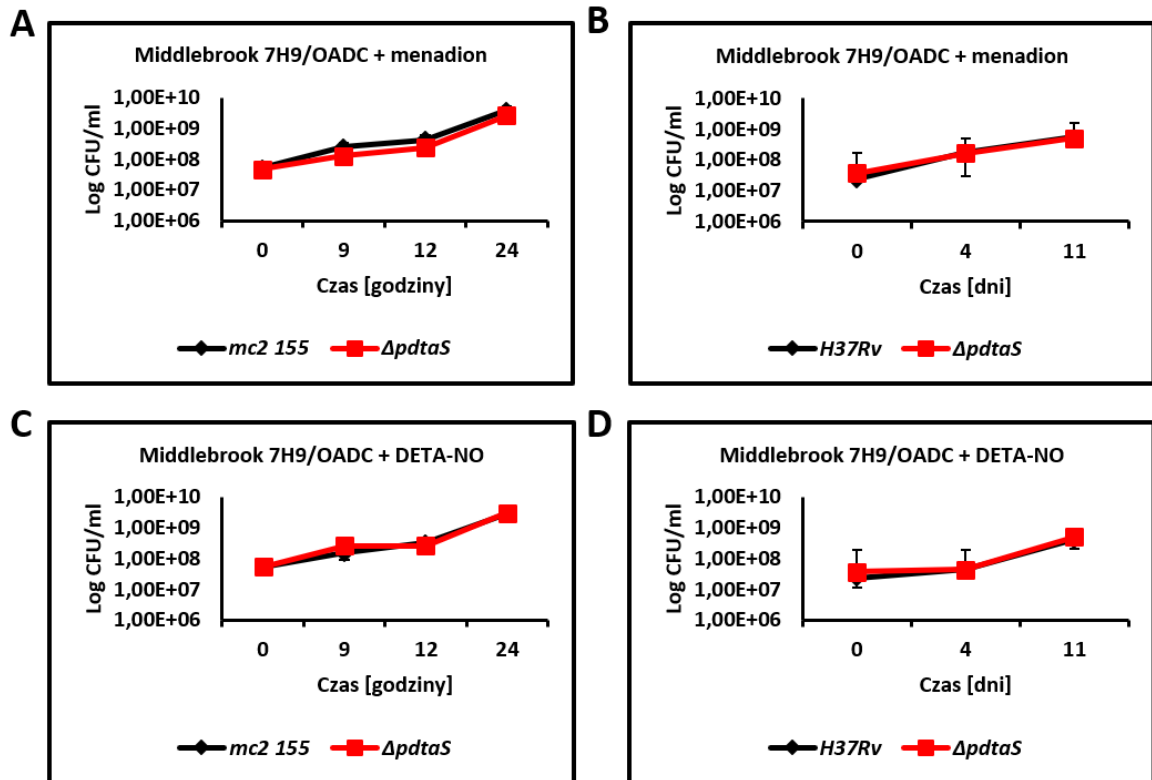
**Rycina 5.5.** Analiza fenotypowa szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*. Analiza kinetyki wzrostu komórek szczepów *M. smegmatis* (**A**) i *M. tuberculosis* (**B**) pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtA*S hodowanych w podłożu Middlebrook 7H9/OADC. Analiza przeżywalności (CFU) komórek szczepów *M. smegmatis* (**C**) i *M. tuberculosis* (**D**)

pozbawionych funkcjonalnego genu *pdtaS*. Hodowlę bakterii posiano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC.

### **5.3. Analiza przeżywalności szczepów $\Delta pdtaS$ *M. smegmatis* oraz $\Delta pdtaS$ *M. tuberculosis* w obecności reaktywnych form tlenu i azotu**

Aby poznać rolę białka PdtaS w komórkach prątków, zmutowane szczepy  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* poddano działaniu menadionu lub DETA-NO. Związki te generują wolne rodniki. Wrażliwość szczepu dzikiego oraz mutantów  $\Delta pdtaS$  na reaktywne formy tlenu oceniono na podstawie przeżywalności w bogatym podłożu w obecności menadionu (150  $\mu$ M dla *M. smegmatis* oraz 10  $\mu$ M dla *M. tuberculosis*), syntetycznej prowitaminy rozpuszczalnej w tłuszczach. Wrażliwość szczepu dzikiego oraz mutantów  $\Delta pdtaS$  na reaktywne formy azotu oceniono na podstawie przeżywalności w podłożu bogatym w obecności DETA/NO (1000  $\mu$ M dla *M. smegmatis* oraz 25  $\mu$ M dla *M. tuberculosis*). Obecność wolnych rodników pozwalała na częściowe odwzorowanie warunków panujących w komórkach fagocytarnych podczas zakażenia. Aby zweryfikować czy zmutowane szczepy pozbawione funkcjonalnego genu *pdtaS* wykazują odmienną przeżywalność w obecności wolnych rodników, dokonano oznaczenia liczby drobnoustrojów na szalkach Petriego (CFU). Komórki szczepów hodowano w podłożu Middlebrook 7H9/OADC z dodatkiem menadionu lub DETA-NO. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.27**.

Analiza przeżywalności (CFU/ml) komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*, pozbawionych zdolności do syntezy funkcjonalnego białka PdtaS, hodowanych w obecności DETA/NO lub menadionu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w przeżywalności komórek w porównaniu do szczepów kontrolnych *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis* lub *H37Rv* *M. tuberculosis* (**Rycina 5.6.**). Eksperyment przeprowadzono w trzech biologicznych powtórzeniach, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.



**Rycina 5.6.** Analiza przeżywalności (CFU/ml) komórek mykobakterii hodowanych w obecności reaktywnych form tlenu lub azotu. Analiza przeżywalności  $\Delta pdtA5$  *M. smegmatis* hodowanych w obecności menadionu (A) lub DETA-NO (C). Analiza przeżywalności  $\Delta pdtA5$  *M. tuberculosis* hodowanych w obecności menadionu (B) lub DETA-NO (D).

#### 5.4. Charakterystyka komórek $\Delta pdtA5$ z wykorzystaniem macierzy fenotypowych

Aby określić wpływ braku funkcjonalnego genu *pdtA5* na komórki prątków wykorzystano analizę macierzy fenotypowych firmy BIOLOG. Wykorzystanie tej metody przesiewowej umożliwia szybkie testowanie aktywności metabolicznej bakterii w obecności wielu związków chemicznych (antybiotyków, detergentów, utleniaczy, związków toksycznych). W badaniach wykorzystano 10 komercyjnych płytek PM (PM11-20) zawierających 240 związków chemicznych, każdy w 4 stężeniach. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.25**.

Weryfikacja otrzymanych wyników opierała się na porównaniu wartości AUC (pola powierzchni pod krzywą aktywności metabolicznej) otrzymanej dla zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* z wynikami otrzymanymi dla szczepu typu „dzikiego”. Za wyniki istotne statystycznie, świadczące o zmienionej aktywności metabolicznej zmutowanego szczepu, przyjęto dane w przypadku których różnica AUC pomiędzy szczepami wynosiła ponad 8500. W wyniku analizy danych otrzymanych z macierzy fenotypowych zaobserwowano istotne zmiany w aktywności metabolicznej zmutowanego szczepu. Największe różnice AUC zaobserwowano w przypadku antybiotyków aminoglikozydowych ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu, inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transport elektronów. Różnice te przedstawiono w **Tabeli 5.1**. Komplet wyników uzyskanych z zastosowaniem macierzy fenotypowych jest dostępny w postaci „Supplementary Materials” (Table S2) na stronie <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5676007/>.

Szczep pozbawiony funkcjonalnego genu *ΔpdtA* *M. smegmatis* charakteryzował się zwiększoną aktywnością metaboliczną w obecności:

- antybiotyku aminoglikozydowego: dihydrostreptomycyny (> 22000),
- inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transportu elektronów, takich jak: kolistyna i fiolet tetrazoliowy (> 14000),
- innych leków, takich jak: tetracyklina (> 21000), ryfampicyna (> 16000).

Szczep pozbawiony funkcjonalnego genu *ΔpdtA* *M. smegmatis* charakteryzował się zmniejszoną aktywnością metaboliczną w obecności:

- szeregu innych antybiotyków aminoglikozydowych takich jak: tobramycyna (> -21000), sisomycyna, apramycyna (> -13000), neomycyna (> -12000), streptomycyna (> -10000), amikacyna (> -9000) i gentamycyna (> -8500),
- inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transportu elektronów, takich jak: pentachlorofenol (> -20000), menadion i heksachlorofen (> -10000) sangwinaryna (> -15000) i chlorowodorek guanidyny (> -14000),
- innych leków, takich jak: etionamid (> -10000)

Co istotne, amikacyna, kanamycyna, streptomycyna, tetracyklina, ryfampicyna, etionamid są stosowane obecnie jako leki przeciwgruźlicze, a ich zmieniona skuteczność przez profil ekspresji *ptaS* może bezpośrednio wpływać na skuteczność leczenia.

**Tabela 5.1.** Największe różnice AUC, otrzymane dla zmutowanego szczepu  $\Delta ptaS$  *M. smegmatis*, uzyskane w wyniku analizy macierzy fenotypowych firmy BIOLOG.

Płytki	Związek	Mechanizm działania	Różnica AUC
PM12B	Tobramycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	-21543,5
PM18C	Pentachlorofenol	Inhibitor łańcucha oddechowego	-20225,5
PM14A	Sangwinaryna	Transport elektronów	-15483,8
PM15B	Chlorowodorek guanidyny	Transport elektronów	-14717
PM12B	Sisomicina	Antybiotyk aminoglikozydowy	-13559,8
PM20B	Apramycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	-13379
PM11C	Neomycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	-12469,3
PM16A	Streptomycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	-11043
PM17A	Etionamid	Lek przeciwgruźliczy	-10796,8
PM20B	Heksachlorofen	Transport elektronów	-10475,3
PM15B	Menadion	Inhibitor łańcucha oddechowego	-10417
PM11C	Amikacina	Antybiotyk aminoglikozydowy	-9401,25
PM11C	Gentamycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	-8937,25
PM11C	Kolistyna	Transport elektronów	14569
PM19	Fiolet tetrazoliowy	Inhibitor łańcucha oddechowego	14817,75
PM12B	Ryfampicyna	Antybiotyk ansamycynowy	16356,25
PM12B	Tetracyklina	Antybiotyk tetracyklinowy	21061
PM19	Dihydrostreptomycyna	Antybiotyk aminoglikozydowy	22550

## 5.5. Analiza wrażliwości szczepu *M. smegmatis* pozbawionego funkcjonalnego genu *pdtaS* na antybiotyki ukierunkowane na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego

### 5.5.1. Analiza wrażliwości komórek mykobakterii na wybrane antybiotyki z wykorzystaniem testu kropkowego (ang. spot assay) na podłożu stałym

Analiza macierzy fenotypowych dla mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* wykazała szereg zmian w aktywności metabolicznej badanego szczepu, hodowanego w obecności antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego, w porównaniu do szczepu kontrolnego. Wyniki uzyskane za pomocą macierzy fenotypowych weryfikowano wykorzystując test kropkowy. W eksperymencie tym seryjne rozcieńczenia badanych szczepów nakrapiane są na podłoże stałe zawierające znane stężenia testowanych antybiotyków. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.26**. Do doświadczeń wybrano antybiotyki aminoglikozydowe charakteryzujące się wysoką stabilnością w podłożu stałym jak również dobrze scharakteryzowanym sposobem działania, były to: apramycyna, sisomycyna, streptomycyna, dihydrostreptomycyna i kanamycyna.

Wyniki testu kropkowego wykazały zwiększoną wrażliwość komórek szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na wszystkie testowane antybiotyki (apramycyna, sisomycyna, streptomycyna, dihydrostreptomycyna i kanamycyna), a więc potwierdzają dane otrzymane w analizie macierzy fenotypowych, dla wszystkich testowanych antybiotyków z wyjątkiem dihydrostreptomycyny. Macierze fenotypowe wykazały zwiększoną aktywność metaboliczną zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* w obecności dihydrostreptomycyny, natomiast test kropkowy zwiększoną wrażliwość zmutowanego szczepu na ten antybiotyk. Test kropkowy powtórzono co najmniej trzykrotnie dla każdego związku. Prezentowane dane to przykład jednego z trzech niezależnych eksperymentów. Otrzymane w teście kropkowym wyniki zamieszczono na **Rycinie 5.7**.

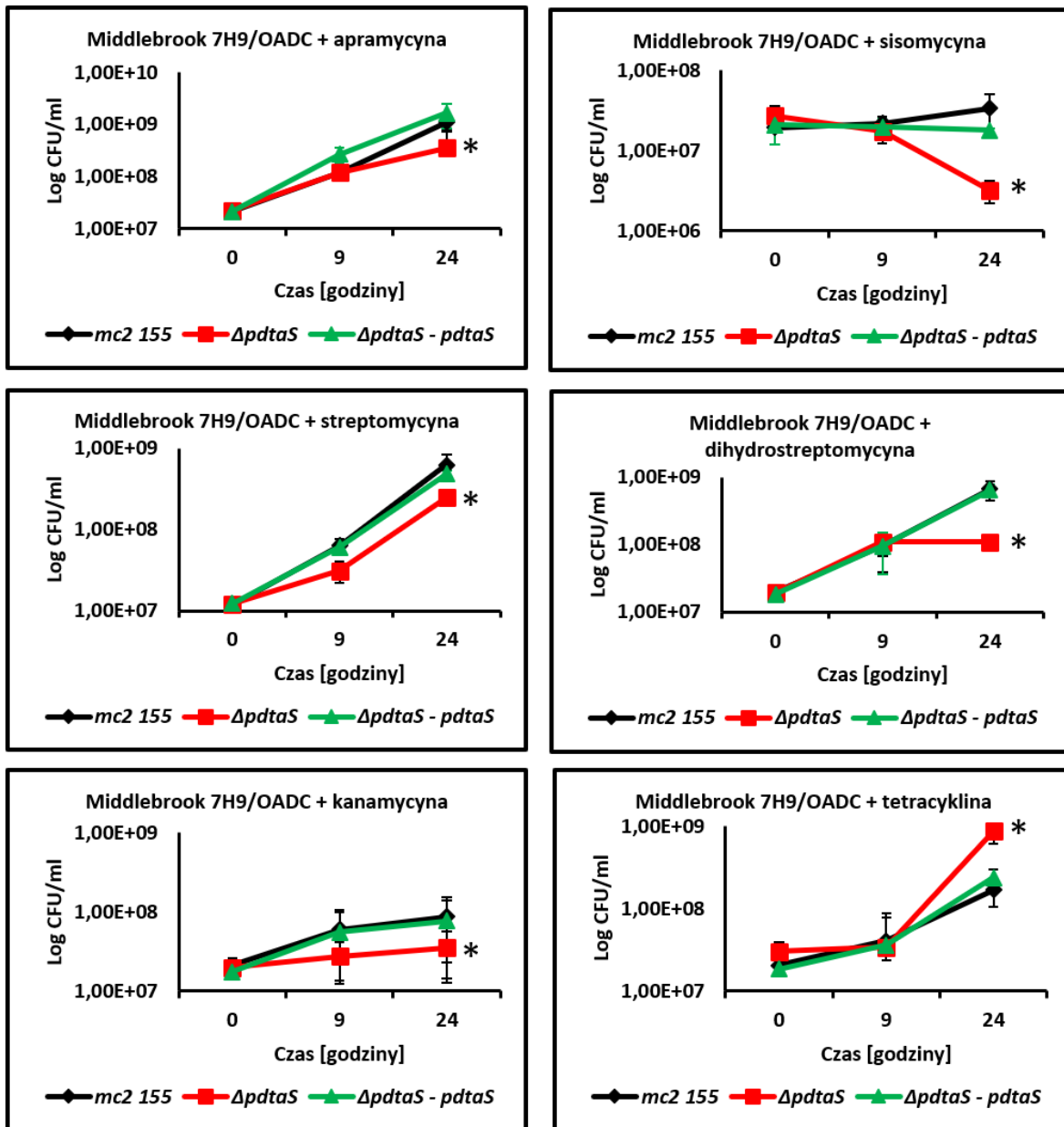




### 5.5.2. Analiza przeżywalności komórek *M. smegmatis* hodowanych w obecności antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego

W celu zweryfikowania wyników otrzymanych w analizie macierzy fenotypowych i teście kropkowym, wykonano analizę przeżywalności szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* w obecności antybiotyków aminoglikozydowych, określając ilość jednostek tworzących kolonie na mililitr (CFU/ml) hodowli bakterii z dodatkiem badanych antybiotyków (apramycyna, sisomycyna, streptomycyna, dihydrostreptomycyna, kanamycyna, tetracyklina). Stężenia stosowanych antybiotyków wybrano na podstawie wyników uzyskanych w teście kropkowym. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.27**.

W wyniku analizy przeżywalności komórek *M. smegmatis* wykazano istotne zmniejszenie ilości jednostek koloniotwórczych w przypadku szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis*, hodowanego w podłożu płynnym z dodatkiem testowanych antybiotyków aminoglikozydowych (apramycyna, sisomycyna, streptomycyna, dihydrostreptomycyna, kanamycyna), w porównaniu do szczepów kontrolnych mc<sup>2</sup>155 *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdaS$ -*pdaS* *M. smegmatis*. W fazie stacjonarnej wzrostu wykazano zmniejszenie przeżywalności komórek szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* o około 60% w przypadku hodowli komórek z dodatkiem kanamycyny (2,0 µg/ml) lub streptomycyny (0,5 µg/ml). Natomiast, dodatek apramycyny (0,55 µg/ml), dihydrostreptomycyny (0,5 µg/ml) lub sisomycyny (2,3 µg/ml) spowodował zmniejszenie przeżywalności  $\Delta pdaS$  o odpowiednio 75%, 80% lub 90% w porównaniu do przeżywalności szczepów kontrolnych. Odwrotny efekt zaobserwowano w przypadku badania wrażliwości na tetracyklinę. Przeżywalność szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis*, hodowanego w podłożu płynnym z dodatkiem tetracykliny (0,1 µg/ml), była większa o około 65% w porównaniu do przeżywalności szczepu kontrolnego. Wszystkie obserwowane fenotypy były w pełni odwracalne, gdy do zmutowanego szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* wprowadzono komplementacyjną kopię genu *pdaS*. Prezentowane dane stanowią średnią z trzech powtórzeń eksperymentu. Istotność statystyczną uzyskanych wyników weryfikowano z wykorzystaniem testu t-Studenta. Wyniki przedstawiona na **Rycinie 5.8**.



**Rycina 5.8.** Analiza przeżywalności komórek *M. smegmatis* hodowanych w obecności antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego: apramycynę 0,55  $\mu\text{g/ml}$ , sisomycynę 2,3  $\mu\text{g/ml}$ , streptomycynę 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , dihydrostreptomycynę 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , kanamycynę 2  $\mu\text{g/ml}$  tetracyklinę 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Wszystkie różnice oznaczone symbolem \* są istotne statystycznie, co zweryfikowano testem t-Studenta  $p < 0,01$ .

### 5.5.3. Określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost szczepów w obecności wybranych antybiotyków ukierunkowanych na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego

Kolejnym testem weryfikującym zmienioną wrażliwość zmutowanego szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* na antybiotyki ukierunkowane na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego było określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Alamar Blue. Metoda ta polega na zmianie koloru wskaźnika redoks (Alamar Blue) z niebieskiego na różowy spowodowanej przez metabolizm bakterii [Leonard i wsp., 2008]. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.28**. Uzyskane wartości MIC przedstawiono w **Tabeli 5.2**.

**Tabela 5.2.** Minimalne stężenia hamujące wzrost badanych szczepów *M. smegmatis* w obecności antybiotyków oddziałujących na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego.

MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Antybiotyki	<i>mc<sup>2</sup> 155</i>	$\Delta pdaS$	$\Delta pdaS - pdaS$
Kanamycyna	1,5	<b>0,75</b>	1,5
Streptomycyna	0,625	<b>0,312</b>	0,625
Dihydrostreptomycyna	0,312	<b>0,156</b>	0,312
Apramycyna	1,25	1,25	1,25
Sisomycyna	2	2	2
Tetracyklina	0,25	<b>0,5</b>	0,25

Wyniki analizy dotyczącej określenia minimalnego stężenia hamującego wzrost potwierdziły zwiększoną wrażliwość zmutowanego szczepu  $\Delta pdaS$  na kanamycynę, streptomycynę i dihydrostreptomycynę oraz zwiększoną oporność mutantu  $\Delta pdaS$  na tetracyklinę. Wartości MIC kanamycyny, streptomycyny i dihydrostreptomycyny dla szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* wynosiły odpowiednio: 0,75  $\mu\text{g/ml}$ , 0,312  $\mu\text{g/ml}$  i 0,156  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast dla szczepów kontrolnych *mc<sup>2</sup>155 M. smegmatis* oraz  $\Delta pdaS$ -*pdaS M. smegmatis* ich wartości były dwukrotnie wyższe i wynosiły odpowiednio: 1,5  $\mu\text{g/ml}$ , 0,625

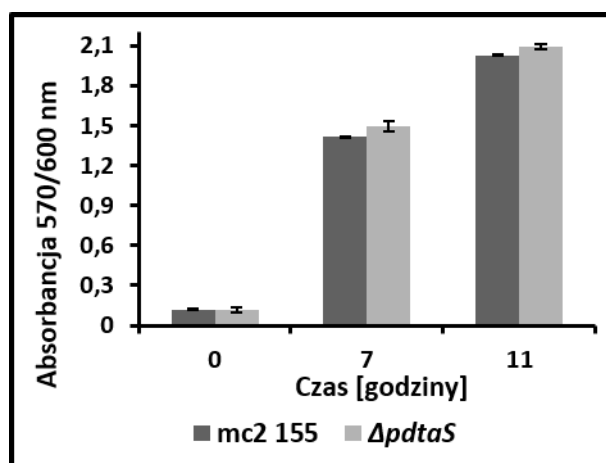
$\mu\text{g/ml}$  i  $0,312 \mu\text{g/ml}$ . Uzyskany MIC w przypadku tetracykliny wynosił  $0,5 \mu\text{g/ml}$  dla szczepu  $\Delta\text{pdtaS}$  *M. smegmatis* oraz  $0,25 \mu\text{g/ml}$  dla szczepów kontrolnych.

Pomimo uzyskanych różnic w teście kropkowym i analizie przeżywalności (CFU), wartości MIC w przypadku apramycyny i sisomycyny dla szczepu  $\Delta\text{pdtaS}$  *M. smegmatis* nie różniły się od wartości MIC uzyskanej dla komórek szczepów kontrolnych  $\text{mc}^2155$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta\text{pdtaS-pdtaS}$  *M. smegmatis*. Wartość MIC apramycyny dla wszystkich badanych szczepów wynosiła  $1,25 \mu\text{g/ml}$ , natomiast sisomycyny  $2 \mu\text{g/ml}$ . Wszystkie prezentowane wyniki MIC pochodzą z trzech niezależnych powtórzeń.

## 5.6. Analiza funkcjonowania łańcucha oddechowego *M. smegmatis*

### 5.6.1. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem mikroplótkowego testu w obecności Alamar Blue

Dane uzyskane z mikromierzy fenotypowych wykazują zmianę wrażliwości komórek rekombinowanego szczepu  $\Delta\text{pdtaS}$  *M. smegmatis* na inhibitory łańcucha oddechowego w porównaniu do komórek szczepu kontrolnego  $\text{mc}^2155$  *M. smegmatis*. Aby zweryfikować te wyniki wykonano test redukcji wskaźnika redoks Alamar blue przez komórki *M. smegmatis* (Rycina 5.9).

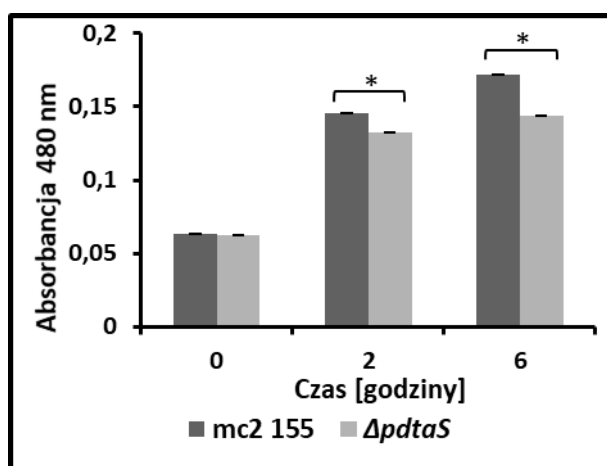


**Rycina 5.9.** Redukcja Alamar blue w czasie przez komórki  $\Delta\text{pdtaS}$  oraz szczepu dzikiego  $\text{mc}^2155$  *M. smegmatis*.

Stosowany w tej metodzie komercyjny odczynnik zawiera resazurynę, powszechnie stosowany wskaźnik redoks oddychania komórkowego. W teście tym resazuryna pełni rolę akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym. W wyniku eksperymentu dowiedziono, że komórki szczepu  $\Delta pdtA$  *M. smegmatis* nie wykazały istotnych zmian w zdolności redukcji resazuryny, w porównaniu do komórek szczepu dzikiego  $mc^2155$  *M. smegmatis*. Dokładny opis przeprowadzonej analizy zamieszczono w rozdziale **Metody 4.30**. Uzyskane dane stanowią wartość średnią z trzech biologicznych powtórzeń eksperymentu, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.

### 5.6.2. Test aktywności oddechowej z wykorzystaniem chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC)

Kolejną metodą weryfikującą dane uzyskane z macierzy fenotypowych, wykazującą zmianę wrażliwości komórek rekombinowanego szczepu  $\Delta pdtA$  *M. smegmatis* na inhibitory łańcucha oddechowego, był test redukcji TTC przez komórki *M. smegmatis* (Rycina 5.10.).



**Rycina 5.10.** Redukcja TTC przez komórki  $\Delta pdtA$  oraz  $mc^2155$  *M. smegmatis*. Wszystkie różnice oznaczone symbolem \* ( $p < 0.001$ ) są istotne statystycznie, co zweryfikowano testem t-Studenta.

Metoda ta polega na redukcji bezbarwnego TTC, będącego wskaźnikiem redoks oddychania komórkowego do czerwonego TPF (1,3,5-trifenyloformazanu). W teście tym TTC pełni rolę akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym. Dokładny opis

przeprowadzonej analizy zamieszczono w rozdziale **Metody 4.31**. Wykazano, że szczep  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* wykazywał istotnie zmniejszoną zdolność do redukcji TTC, o około 9% i 17% odpowiednio w 2 i 6 godzinie eksperymentu, w porównaniu do zdolności redukcji TTC przez szczep typu dzikiego. Uzyskane dane stanowią wartość średnią z trzech niezależnych powtórzeń, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.

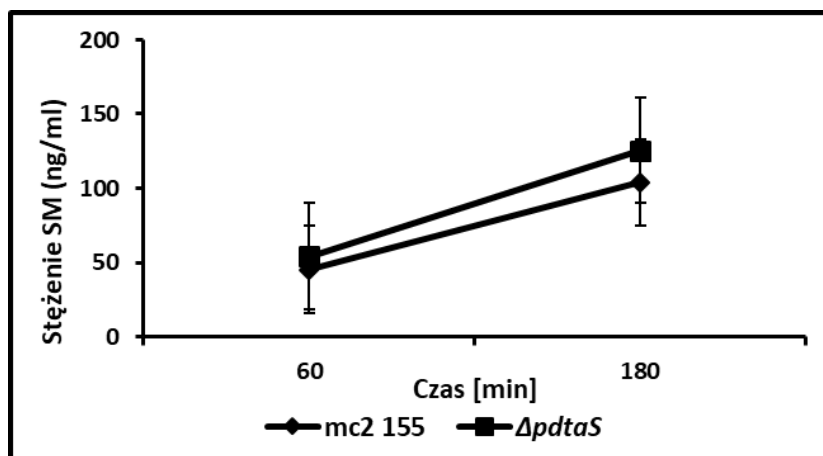
### 5.6.3. Analiza wnikania streptomycyny do komórek *Mycobacterium smegmatis*

Z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologicznych (**Wyniki 5.5**) wykazano, że komórki  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* charakteryzują się zwiększoną wrażliwością na antybiotyki aminoglikozydowe. Taki efekt może być potencjalnie związany ze zmianą skuteczności wnikania aminoglikozydów do zmutowanych komórek. Dane literaturowe wskazują, że wnikanie aminoglikozydów do komórek bakteryjnych jest zależne od wydajności przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy [Taber i wsp., 1987]. Test redukcji TTC wykazał niewielkie, ale istotne statystycznie zmiany w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego komórek szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis*.

Aby ocenić czy komórki szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* charakteryzują się zdolnością do zwiększonego wychwytu antybiotyków aminoglikozydowych zbadano wewnątrzkomórkowe stężenie streptomycyny. Komórki bakteryjne w fazie logarytmicznego wzrostu eksponowano na obecność streptomycyny w stężeniu 0,7  $\mu\text{g/ml}$ . Kontrolę stanowiły komórki inkubowane bez antybiotyku. Lizaty komórkowe otrzymane po rozbiciu komórek wykorzystano do pomiaru stężenia streptomycyny za pomocą komercyjnego testu immunoenzymatycznego ELISA. Dokładny opis przeprowadzonej analizy zamieszczono w rozdziale **Metody 4.29**.

Pomimo iż, stężenia streptomycyny w przypadku komórek szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* były wyższe w porównaniu do komórek szczepu kontrolnego  $mc^2155$  *M. smegmatis*, różnica ta okazała się nieistotna statystycznie. W 60 minucie eksperymentu stężenie streptomycyny w komórkach  $mc^2155$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* wynosiło odpowiednio: 45,35 ( $\pm$  15,83) i 54,22 ( $\pm$  5,18) ng/ml, natomiast w 180 minucie 103,89 ( $\pm$  19,94) i 125,45 ( $\pm$  11,45) ng/ml. Dowodzi to, że zwiększona wrażliwość komórek

szczepu  $\Delta pdtA$  *M. smegmatis* na aminoglikozydy nie jest spowodowana podwyższonym stężeniem wewnątrzkomórkowym antybiotyku (**Rycina 5.11.**). Prezentowane dane stanowią wartość średnią z trzech niezależnych eksperymentów, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.



**Rycina 5.11.** Test wnikania streptomycyny (SM) do komórek *M. smegmatis*.

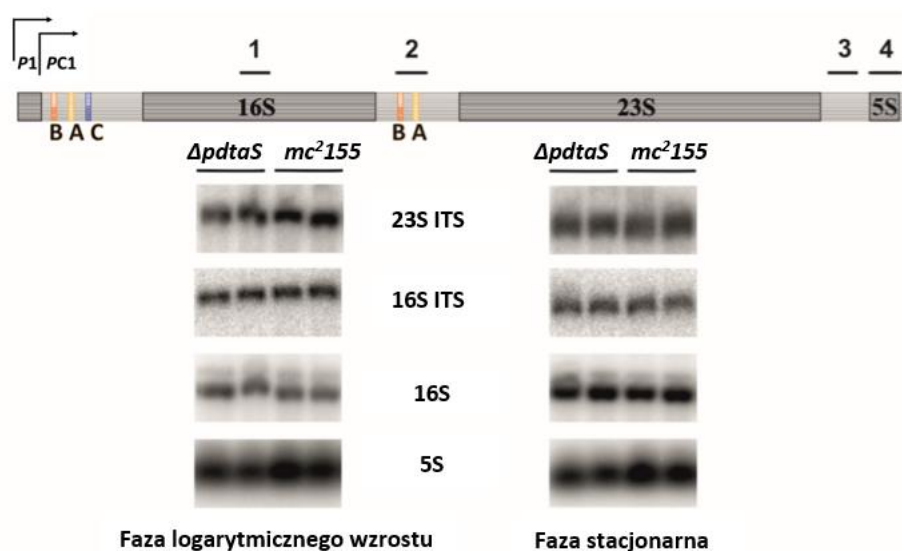
### 5.7. Analiza poziomu ekspresji rRNA w komórkach mutantu $\Delta pdtA$ *M. smegmatis*

W warunkach optymalnego wzrostu w wyniku transkrypcji rRNA u bakterii powstaje pojedynczy, policystronowy transkrypt, co zapewnia prawidłowe fałdowanie struktury drugorzędowej oraz dojrzewanie transkrybowanego pre-rRNA. Końcowo powstają dojrzałe cząsteczki 16S, 23S i 5S rRNA. Regiony kodujące dojrzałe cząsteczki rRNA są rozdzielone zatem przez wewnętrzne sekwencje transkrybowane (ITS). Operon *rrn* zawiera regiony, które wymagają wiązania czynników antyterminacyjnych. Czynniki antyterminacyjne zapobiegają zatrzymaniu polimerazy RNA lub przedwczesnemu rozłączeniu podczas transkrypcji operonu *rrn* [Beuth i wsp., 2005]. Natomiast, brak antyterminacji może nie tylko wpływać na wytwarzanie krótszych cząsteczek pre-rRNA, ale może również prowadzić do nieprawidłowego ich dojrzewania. Ponadto, zgodnie z danymi literaturowymi zmiany w rRNA mogą przełożyć się na zmianę wrażliwości komórek bakteryjnych na aminoglikozydy [Arnvig i wsp., 2004].



### 5.7.1. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern

Zgodnie z danymi literaturowymi PdtA<sub>R</sub>, partner PdtA<sub>S</sub>, bierze udział w antyterminacji transkrypcji. Jako, że proces antyterminacji jest istotny dla poprawności procesu transkrypcji operonu *rrn*, zasadne było przeanalizowanie profili RNA komórek szczepu  $\Delta pdtA$  *M. smegmatis* oraz komórek szczepu typu „dzikiego” *mc*<sup>2</sup>*155* *M. smegmatis*. Analizę rRNA i pre-rRNA przeprowadzono z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern. W metodzie tej wykorzystano radioaktywnie znakowane, specyficzne sondy oligonukleotydowe, zdolne do hybrydyzacji do dojrzałych 16S lub 5S lub prekursorowych cząsteczek 16S i 23S (komplementarne do odpowiednich regionów ITS). Dokładny opis przeprowadzonej analizy zamieszczono w rozdziale **Metody 4.34**.

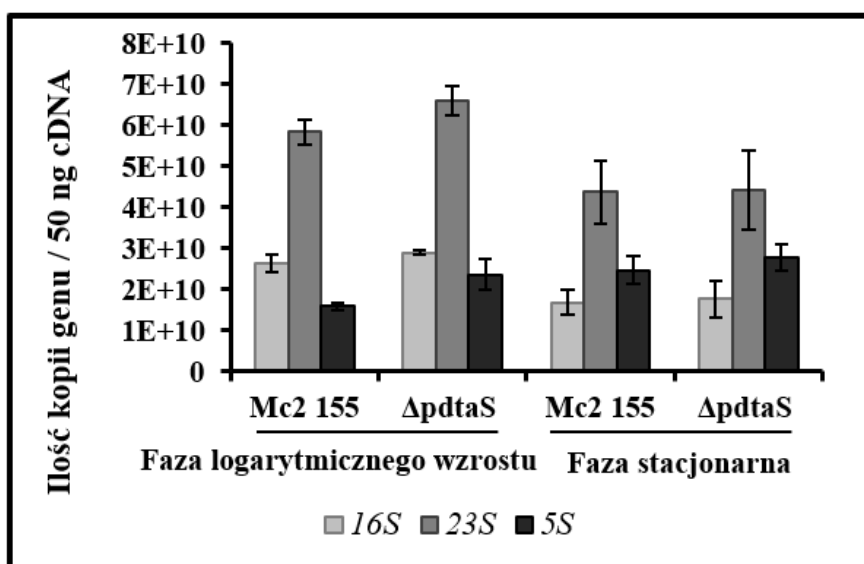


**Rycina 5.12.** Schemat operonu *rrn* *M. smegmatis* z zaznaczonymi miejscami hybrydyzacji typu Northern oraz analiza Northern blot do monitorowania poziomu dojrzałych 16S i 5S i prekursorowych p16S i p23S. **1**-16S dojrzałe; **2**-16S ITS; **3**-23S ITS; **4**-5S dojrzałe.

Z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern, nie zaobserwowano znaczących zmian w proporcjach pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami rRNA oraz pre-rRNA pomiędzy badanymi szczepami ( $\Delta pdtA$  *M. smegmatis* oraz *mc*<sup>2</sup>*155* *M. smegmatis*). Prezentowane dane to przykłady z trzech niezależnych eksperymentów. Otrzymane w analizie Northern blot wyniki zamieszczono na **Rycinie 5.12**.

### 5.7.2. Analiza poziomu transkryptów metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT - PCR)

Aby zweryfikować wyniki otrzymane w wyniku analizy RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern, oceniono poziom transkryptów 16S, 23S i 5S w  $\Delta pdtaS$  oraz  $mc^2155$  *M. smegmatis* za pomocą qRT-PCR. W eksperymencie wykorzystano całkowity RNA pochodzący z komórek w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu. Analizę poziomu ekspresji genów 16S, 23S i 5S metodą qRT-PCR przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników Maxima SYBR green qPCR master mix firmy Life Technologies, a uzyskane wyniki odnoszono do krzywej standardowej poziomu ekspresji genów kodujących 16S, 23S i 5S. Dokładny opis przeprowadzonej analizy zamieszczono w rozdziale **Metody 4.35**. Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomach transkryptów 16S, 23S i 5S pomiędzy komórkami  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, a komórkami typu „dzikiego”, zarówno w fazie logarytmicznego wzrostu jak i fazy stacjonarnej. Otrzymane w analizie qRT-PCR wyniki zamieszczono na **Rycinie 5.13**. Prezentowane dane to wartości średnie i odchylenia standardowe z trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki otrzymane w analizie Northern blot jak i qRT-PCR nie wykazały zmian w rRNA szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, a tym samym nie wyjaśniają przyczyny zwiększonej wrażliwości komórek  $\Delta pdtaS$  na antybiotyki aminoglikozydowe.



**Rycina 5.13.** Analiza poziomów transkryptów 16S, 23S i 5S metodą qRT-PCR.

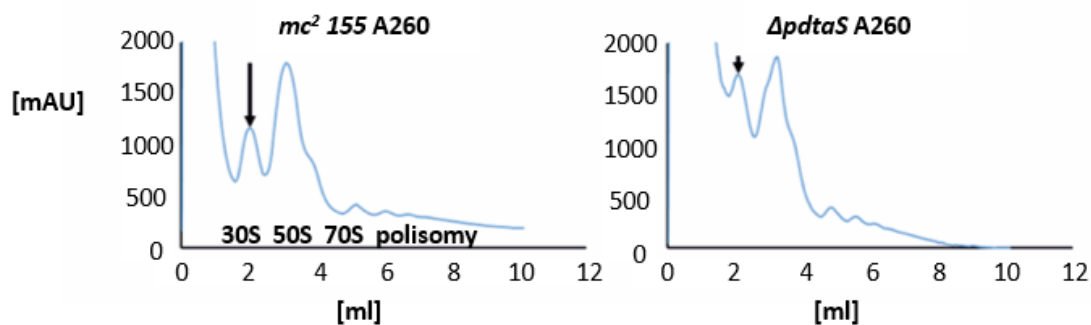
## 5.8. Określenie stosunku ilościowego 30S:50S u $\Delta pdaS$ i szczepu dzikiego *M. smegmatis*

Jako iż, mechanizm działania antybiotyków aminoglikozydowych opiera się na zahamowaniu syntezy białek bakteryjnych poprzez wiązanie się do małej podjednostki rybosomu (30S), a szczep  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* wykazuje zwiększoną wrażliwość na tę klasę antybiotyków, zdecydowano się na przeprowadzenie analizy rybosomu bakteryjnego badanych szczepów.

### 5.8.1. Analiza rybosomów bakteryjnych *M. smegmatis* - rozdział rybosomów w gradiencie sacharozy

Aby zweryfikować, czy brak funkcjonalnego genu *pdaS* powoduje zmiany ilościowe i jakościowe podjednostek rybosomalnych, w pierwszym etapie pracy wyizolowano rybosomy z komórek  $\Delta pdaS$  oraz *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis* przez ultrawierowanie lizatów komórkowych w gradiencie sacharozy. Opis przeprowadzonej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.36**. Zgodnie z danymi literaturowymi, zwykle ilość małej podjednostki rybosomu 30S w komórce jest zbliżona do ilości podjednostki 50S [Shasmal i wsp., 2012]. Pomimo tego podjednostka 50S emituje więcej sygnału w świetle UV 260 lub 280 nm (do wykrywania kwasów nukleinowych lub białka) niż jednostka 30S. Potwierdziły to dane otrzymane z analizy gradientu sacharozy otrzymane dla szczepu *M. smegmatis* typu „dzikiego”.

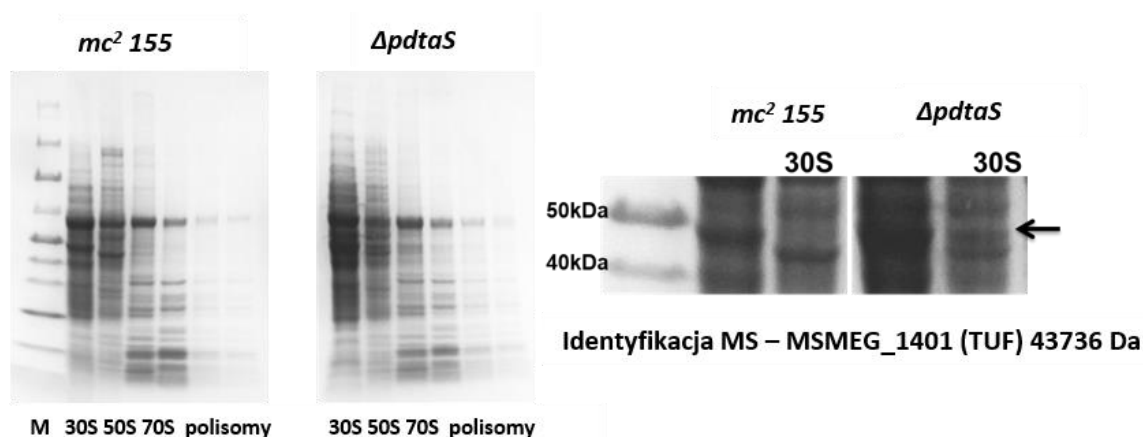
Porównując profile rybosomów otrzymane dla szczepu  $\Delta pdaS$  *M. smegmatis* oraz szczepu *M. smegmatis* typu „dzikiego” zaobserwowano zmianę stosunku ilościowego 30S do 50S z nieproporcjonalną akumulacją małej podjednostki w zmutowanym szczepie pozbawionym funkcjonalnego genu *pdaS*. Otrzymane wyniki po rozdziale rybosomów w gradiencie sacharozy zamieszczono na **Rycinie 5.14**.



**Rycina 5.14.** Analiza rybosomów bakteryjnych *M. smegmatis* - rozdział rybosomów w gradiencie sacharozy. Strzałki wskazują różnice w poziomach podjednostki 30S pomiędzy szczepami.

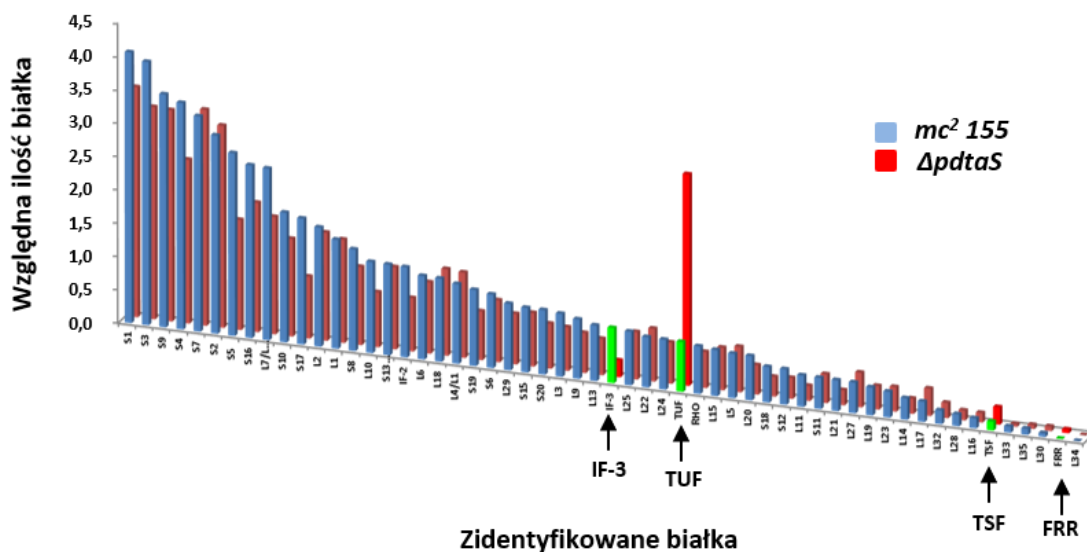
### 5.8.2. Analiza proteomiczna rybosomów *M. smegmatis*

Wyizolowane w gradiencie sacharozy frakcje, odpowiadające poszczególnym podjednostkom rybosomalnym poddano analizie proteomicznej. Opis przeprowadzonej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.37**. Pierwszym etapem analizy był rozdział frakcji z wykorzystaniem elektroforezy SDS-PAGE. Wykryto wizualną różnicę, w postaci pojedynczego prążka białkowego, pomiędzy profilami rybosomu komórek szczepu  $\Delta pdtA S$  *M. smegmatis* oraz komórek szczepu „dzikiego”. Prążek białkowy nadreprezentowany w podjednostce 30S szczepu  $\Delta pdtA S$  *M. smegmatis*, wycięto z żelu SDS-PAGE i zidentyfikowano za pomocą spektrometrii masowej jako czynnik wydłużania translacji TUF (**Rycina 5.15.**).



**Rycina 5.15.** Rozdział SDS-PAGE frakcji zawierających podjednostki rybosomalne. M - marker wielkości białek PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Fracje zawierające podjednostki rybosomalne poddano również całkowitej analizie proteomicznej za pomocą spektrometrii masowej. Identyfikację białek przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania MaxQuant (**Rycina 5.16**). W wyniku analizy wykazano 4 białka w podjednostce 30S komórek mutantu, których ilość była istotnie zmieniona w stosunku do ilości tego białka w komórkach szczepu typu „dzikiego”. Wśród nich znajdowały się 3 białka, których ilość w podjednostce 30S szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* była istotnie zwiększona niż w szczepie typu „dzikiego”, były to: białko TUF nadreprezentowane około pięciokrotnie, czynnik wydłużania translacji TSF nadreprezentowany około dwukrotnie oraz czynnik recyklingu rybosomów FRR nadreprezentowany około dwukrotnie. Wykryto również pojedyncze białko, którego ilość w podjednostce 30S szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* była istotnie zmniejszona niż w szczepie typu „dzikiego”. Białko to zidentyfikowano jako czynnik inicjacji translacji IF-3, a jego ilość była około dwukrotnie niższa w podjednostce 30S zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* w porównaniu do kontroli.



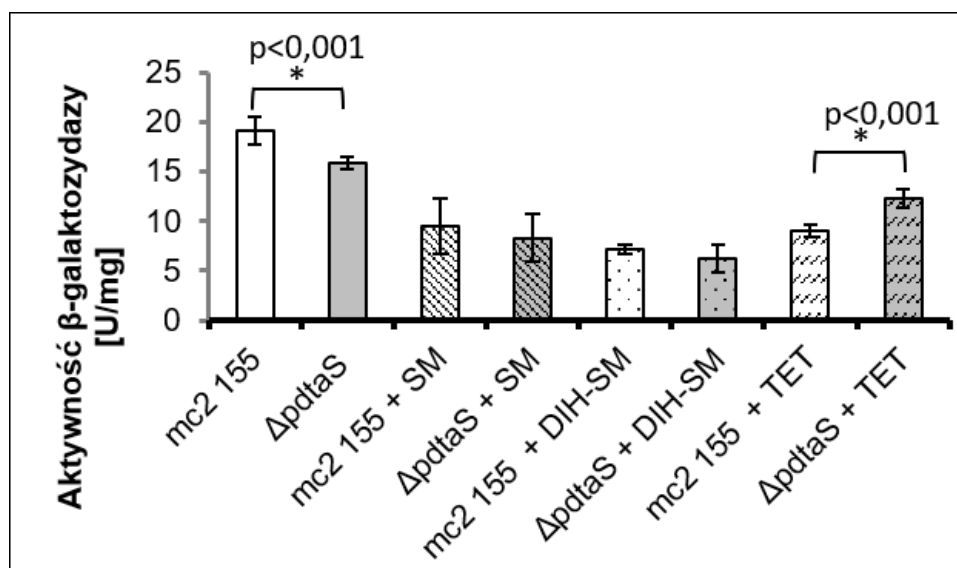
**Rycina 5.16.** Identyfikacja białek wchodzących w skład podjednostki 30S rybosomu, z wykorzystaniem spektrometrii masowej i oprogramowania MaxQuant.

### 5.8.3. Badanie aktywności β- galaktozydazy

Obserwowane zmiany w składzie rybosomu w zmutowanym szczepie *ΔpdtA* *M. smegmatis* mogą potencjalnie wpływać na zmianę szybkości translacji w tym szczepie.

Aby to zweryfikować przeprowadzono test wydajności translacji. Do komórek badanych szczepów ( $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $mc^2155$  *M. smegmatis*) wtransformowano plazmid zawierający gen kodujący enzym  $\beta$ -galaktozydazę, której aktywność można monitorować z wykorzystaniem testu kolorymetrycznego. Opis przeprowadzonej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.38**.

Komórki zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, hodowane w podłożu bez dodatku antybiotyku, wykazywały istotnie zmniejszoną aktywność  $\beta$ -galaktozydazy ( $15,9 \pm 0,64$ ) w porównaniu do komórek szczepu kontrolnego  $mc^2155$  *M. smegmatis* ( $19,15 \pm 1,37$ ). Gdy bakterie hodowano w obecności tetracykliny  $0,1 \mu\text{g/ml}$ , zaobserwowano istotny wzrost aktywności  $\beta$ -galaktozydazy w komórkach zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* ( $12,34 \pm 0,96$ ) w porównaniu do komórek kontrolnych ( $9,02 \pm 0,67$ ). Natomiast, gdy bakterie hodowano w obecności aminoglikozydów (streptomycyny  $0,7 \mu\text{g/ml}$  lub dihydrostreptomycyny  $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy aktywnością  $\beta$ -galaktozydazy w komórkach szczepu zmutowanego i kontrolnego. Otrzymane w analizie wyniki zamieszczono na **Rycinie 5.17**. Prezentowane dane to wartości średnie i odchylenia standardowe z trzech niezależnych eksperymentów, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta.



**Rycina 5.17.** Test aktywności  $\beta$ -galaktozydazy do pomiaru szybkości translacji.

## 5.9. Brak białka PdtaS, a globalna odpowiedź transkrypcyjna

### 5.9.1. Globalna analiza transkrypcyjna mutantów $\Delta pdtaS$ *M. smegmatis* oraz $\Delta pdtaS$ *M. tuberculosis*

Rola białka PdtaS w komórkach prątków oraz czynniki środowiskowe, które odbiera to białko, pozostają dotychczas niedostatecznie poznane. Analiza mikromacierzy fenotypowych zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* wykazała znaczące zmiany we wrażliwości badanego szczepu na antybiotyki ukierunkowane na podjednostkę 30S rybosomu oraz inhibitory łańcucha oddechowego. Dane otrzymane z systemu BIOLOG potwierdzono doświadczalnie. Aby jednak dokładniej poznać udział histydynowej kinazy PdtaS w regulacji procesów metabolicznych mykobakterii, zdecydowano się na poddanie szczepów  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* globalnej analizie transkryptomu. Dzięki tej metodzie porównano globalny profil ekspresji genów szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* lub  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* do profilu komórek szczepów kontrolnych *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis* lub *H37Rv* *M. tuberculosis*. Istotne statystycznie różnice w poziomie transkryptów mogą sugerować potencjalny udział białka PdtaS w procesach, w których uczestniczą dane geny, które uległy zmienionej ekspresji. Opis przeprowadzonej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.33**.

Porównując RNA izolowany z komórek kontrolnego szczepu *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis* z RNA izolowanym z komórek szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, zaobserwowano istotne zmiany w ilości transkryptów ponad 500 genów. Geny pogrupowano ze względu na ich funkcje, wśród nich na największą uwagę zasługują geny kodujące: transportery ABC, pompy oporności wielolekowej, białka uczestniczące w farmakokinetyce antybiotyków, białka odpowiedzialne za wirulencję/detoksyfikację, białka wchodzące w skład rybosomu. Wyniki dla wybranych genów zamieszczono w **Tabeli 5.3**, natomiast pełne dane uzyskane w analizie RNAseq w postaci suplementu Tabela S1.

**Tabela 5.3.** Globalna analiza transkryptomyczna mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* - wybrane największe różnice.

Funkcja	Gen	Różnica
Transportery ABC	MSMEG_0555	+5,6
	MSMEG_0114	+4,6
	MMSMEG_2926	-4,3
	MSMEG_4387	+6,8
	MSMEG_5403	+4,4
	MSMEG_1374	-5
	MSMEG_1372	-6
	MSMEG_2924	-7,2
	MSMEG_2925	-7,8
	MSMEG_6766	-10,4
Farmakokinetyka antybiotyków	MSMEG_3563	-3,4
	MSMEG_0225	+4
	MSMEG_5688	+3
Wirulencja/detoksyfikacja	MSMEG_0817	-4,6
	MSMEG_0225	+4
	MSMEG_6213	-7
	MSMEG_0051	+5,8
Pompy oporności wielolekowej	MSMEG_0763	-3,2
	MSMEG_0225	+4
	MSMEG_2619	+5
	MSMEG_3563	+3,9
	MSMEG_5559	-4,8
	MSMEG_3536	-5
Białka rybosomalne wchodzące w skład podjednostki 30S	MSMEG_6897	+4

Porównując transkryptomy kontrolnego szczepu *H37Rv M. tuberculosis* z transkryptomami szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* zaobserwowano istotne zmiany w ilości transkryptów ponad 50 genów. Geny pogrupowano ze względu na ich funkcje, wśród nich na największą uwagę zasługują geny kodujące: białka związane z metabolizmem azotu, pompy oporności wielolekowej, białka uczestniczące w farmakokinetyce antybiotyków, białka odpowiedzialne za wirulencję/detoksyfikację.



Wyniki dla wybranych genów zamieszczono w **Tabeli 5.4** natomiast pełne dane uzyskane w analizie RNAseq w postaci suplementu Tabela S2.

**Tabela 5.4.** Globalna analiza transkryptomyczna mutantu *ΔpdtA* *M. tuberculosis* - wybrane największe różnice.

Funkcja	Gen	Różnica
Metabolizm azotu	Rv1736c	3,6
	Rv1737c	3,2
Farmakokinetyka antybiotyków	Rv3173c	-3
	Rv0158	-3,2
	Rv3855	-4,2
Wirulencja/detoksyfikacja	Rv3135	-4,2
	Rv2009	-3,8
	Rv2010	-3,6
	Rv1560	-3
Pompy oporności wielolekowej	Rv2846c	-3

### 5.9.2. Analiza wrażliwości zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* na wybrane tuberculostatyki – MIC

Dane uzyskane z globalnej analizy transkryptomów dla komórek szczepów *ΔpdtA* *M. smegmatis* oraz *ΔpdtA* *M. tuberculosis* wykazały szereg zmian w ekspresji genów, które mogą być zaangażowane w mechanizmy oporności na antybiotyki. Aby zweryfikować te dane, z wykorzystaniem mikroplatkowego testu Alamar blue, określono minimalne stężenie hamujące wzrost szczepów (*mc*<sup>2</sup> 155 *M. smegmatis*, *ΔpdtA* *M. smegmatis*, *ΔpdtA-pdtA* *M. smegmatis*) dla wybranych tuberculostatyków. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.28**. Do testu wybrano następujące związki: izoniazyd, ryfampicynę, etambutol, streptomycynę, ofloksacynę, kanamycynę, etionamid, kapreomycynę. Uzyskane wartości MIC przedstawiono w **Tabeli 5.5**.

Wartości MIC w przypadku ryfampicyny, etambutolu, ofloksacyny oraz etionamidu dla komórek zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* nie różniły się od wartości MIC

uzyskanej dla komórek szczepów kontrolnych, (*mc<sup>2</sup>155 M. smegmatis*, *ΔpdtaS-pdtaS M. smegmatis*).

Minimalne stężenia hamujące kanamycyny i streptomycyny są dwukrotnie niższe dla komórek szczepu *ΔpdtaS M. smegmatis* w porównaniu do komórek szczepów kontrolnych. Mechanizm zwiększonej wrażliwości zmutowanego szczepu na aminoglikozydy wyjaśniono w rozdziale **Wyniki 5.8**.

Minimalne stężenia hamujące izoniazydu i kapreomycyny są ośmiokrotnie wyższe dla szczepu *ΔpdtaS M. smegmatis* w porównaniu do szczepów kontrolnych. Mechanizm działania kapreomycyny opiera się na hamowaniu syntezy białek poprzez wiązanie się do jednostki rybosomalnej 70S, która składa się z podjednostki 30S i 50S. Wynik otrzymany dla kapreomycyny można zatem tłumaczyć zaburzonym stosunkiem ilościowym 30S do 50S z nieproporcjonalną akumulacją małej podjednostki w mutancie *ΔpdtaS M. smegmatis*. Isoniazyd natomiast hamuje syntezę kwasów mykoloowych u prątków, a zwiększoną oporność na ten lek u *ΔpdtaS M. smegmatis* próbowano wyjaśnić w dalszej części pracy.

**Tabela 5.5.** Minimalne stężenia hamujące wzrost badanych szczepów *M. smegmatis* przez badane tuberkulostatyki.

Antybiotyki	MIC (μg/ml)		
	<i>mc<sup>2</sup> 155</i>	<i>ΔpdtaS</i>	<i>ΔpdtaS - pdtaS</i>
Isoniazyd	7,8	<b>62,5</b>	7,8
Ryfampicyna	5	5	5
Etambutol	0,25	0,25	0,25
Streptomycyna	0,625	<b>0,312</b>	0,625
Ofloksacyna	0,25	0,25	0,25
Kanamycyna	1,5	<b>0,75</b>	1,5
Etionamid	100	100	100
Kapreomycyna	3,125	<b>25</b>	3,125

### 5.9.3. Analiza wrażliwości szczepów *M. smegmatis* na izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej – MIC

Z wykorzystaniem mikro płytkowego testu Alamar blue określono minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost badanych szczepów (*mc<sup>2</sup> 155 M. smegmatis*, *ΔpdtA S M. smegmatis*, *ΔpdtA S-pdtA S M. smegmatis*) przez izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.28**. Wybrano następujące inhibitory pomp oporności wielolekowej: rezerpinę, walinomycynę i werapamil. Rezerpina jest inhibitorem pomp, który hamuje działanie białek rodziny RND (*ang. resistance-nodulation-cell division*) oraz MFS (*ang. major facilitator superfamily*). Werapamil hamuje aktywność transporterów wiążących ATP (ABC) i pomp MDR (*ang. multidrug resistance pumps*). Natomiast walinomycyna jest inhibitorem pomp MSF oraz transporterów wiążących ATP (ABC). Uzyskane wartości MIC przedstawiono w **Tabeli 5.6**.

Wartości MIC w przypadku izoniazylu w obecności: rezerpiny, walinomycyny lub werapamilu, dla komórek *ΔpdtA S M. smegmatis* nie różniły się od wartości MIC uzyskanych dla komórek tego szczepu hodowanego z dodatkiem samego izoniazylu. Zatem zwiększona oporność *ΔpdtA S* na izoniazyd nie jest związana z mechanizmami aktywnego wypompowywania leku z komórki przez pompy oporności wielolekowej na które działają badane inhibitory pomp (rezerpina, walinomycyna i werapamil).

**Tabela 5.6.** Minimalne stężenia hamujące wzrost badanych szczepów *M. smegmatis* przez izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej.

MIC (μg/ml)			
Antybiotyki	<i>mc<sup>2</sup> 155</i>	<i>ΔpdtA S</i>	<i>ΔpdtA S - pdtA S</i>
Izoniazyd	7,8	<b>62,5</b>	7,8
Izoniazyd + Rezerpina	7,8	<b>62,5</b>	7,8
Izoniazyd+ Walinomycyna	7,8	<b>62,5</b>	7,8
Izoniazyd + Werapamil	7,8	<b>62,5</b>	7,8

#### 5.9.4. Oznaczenie aktywności katalazy w komórkach szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis*

Isoniazyd jest prolekiem, który musi być aktywowany przez katalazę bakteryjną (KatG). Mechanizm działania tego leku opiera się na wpływie na aktywność dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) czego wynikiem jest tworzenie nieaktywnego analogu NADH. Zaburza to szereg procesów życiowych prątki, w tym hamuje syntezę kwasów mykoloowych, składników ich ściany komórkowej.

Aby zweryfikować, czy zwiększona oporność zmutowanego szczepu jest związana z zaburzoną aktywacją izoniazylu w komórce, przeprowadzono test aktywności katalazy dla komórek szczepów *ΔpdtA* *M. smegmatis* oraz komórek szczepu typu „dzikiego” *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis*. Spadek mierzonej absorbancji przy długości fali 240 nm, był zależny od aktywności katalazy. Następnie z różnicy absorbancji wyliczono aktywność katalazy dla komórek badanych szczepów. Dokładny opis wykonanej procedury zamieszczono w rozdziale **Metody 4.39**. Aktywność katalazy dla komórek szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis*, wynosiła 0,43 U/mg i była trzykrotnie niższa niż w przypadku komórek szczepu kontrolnego *mc<sup>2</sup>155* *M. smegmatis*, dla którego wynosiła 1,3 U/mg. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego szczepu, a istotność statystyczną uzyskanych wyników analizowano testem t-Studenta ( $p < 0.001$ ).

Uzyskana zależność może być wytłumaczeniem zwiększonej oporności komórek zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* na izoniazyl, ponieważ niższa aktywność katalazy wpływa na niższy stopień aktywacji proleku jakim jest izoniazyl.

#### 5.9.5. Analiza obecności mutacji warunkujących oporność na izoniazyl w szczepie *ΔpdtA* *M. smegmatis*

Jednym z mechanizmów, powodującym nabywanie lekooporności przez prątki, jest występowanie mutacji w genach kodujących: cele dla leków lub enzymy aktywujące leki. W niniejszej pracy doktorskiej, wykazano, że komórki szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* charakteryzują się zwiększoną opornością na izoniazyl. Globalna analiza transkryptomu komórek mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis* ujawniła szereg znaczących zmian w poziomie transkryptów genów związanych z niespecyficzną opornością na antybiotyki m.in. genów kodujących pompy oporności wielolekowej. Jednak wartości MIC dla izoniazylu uzyskane

dla komórek mutantów były identyczne jak wartości MIC dla izoniazydu w obecności badanych inhibitorów pomp oporności wielolekowej. Ponadto wykazano, że w szczepie *ΔpdtaS M. smegmatis* aktywność katalazy, aktywatora izoniazydu, była trzykrotnie niższa niż w przypadku komórek szczepu kontrolnego *mc<sup>2</sup>155 M. smegmatis*. Nabycie oporności na izoniazyd może być związane z akumulacją mutacji w genach kodujących białka docelowe lub enzymy aktywujące prolek w tym w genie *katG*. Zasadne jest zatem pytanie czy zmieniona aktywność katalazy w komórkach szczepu *ΔpdtaS M. smegmatis* związana jest z obecnością mutacji w genie *katG*, którego produkt odpowiedzialny jest za aktywację izoniazydu, jak również czy występują mutacje w innych genach kodujących produkty odpowiedzialne za nabywanie oporności na izoniazyd. Analiza sekwencji transkryptów uzyskanych podczas globalnego sekwencjonowania RNA wykazała brak akumulacji mutacji w genach takich jak *katG* (katalaza-peroksydaza), *inhA* (reduktaza enoilo-ACP), *ndh* (dehydrogenaza NADH), *ahpC* (reduktaza wodoronadtlenków alkilowych) opisanych w literaturze jako najczęściej akumulujące mutacje związane z opornością na izoniazyd u szczepów klinicznych prątków gruźlicy. Uzyskane wyniki wskazują, że zwiększona oporność szczepu *ΔpdtaS M. smegmatis* na izoniazyd nie wynika z akumulacji mutacji w genach związanych z nabywaniem oporności na izoniazyd.

## 6. Dyskusja

*Mycobacterium tuberculosis* jest czynnikiem etiologicznym gruźlicy - choroby, na którą co roku umiera wiele milionów ludzi na całym świecie. W ostatnich latach obserwuje się intensywny wzrost liczby szczepów wielolekoopornych, przeciwko którym współczesna medycyna bywa bezradna. Sukces *M. tuberculosis* jako patogenu związany jest ze zdolnością tych bakterii do adaptacji do różnorodnych warunków bytowania w organizmie człowieka na różnych etapach infekcji, dzięki szybkiej i adekwatnej odpowiedzi na sygnały docierające z otoczenia. Aby szybko i efektywnie przystosowywać się do zmieniających się warunków otoczenia, komórki mykobakterii wykorzystują dwuskładnikowe systemy regulacyjne (TCSs). Białko PdtA<sub>S</sub>, będące przedmiotem badań niniejszej pracy, wchodzi w skład dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału (TCSs) PdtA<sub>R</sub>/PdtA<sub>S</sub>. Funkcją sensorowej kinazy PdtA<sub>S</sub> jest autofosforylacja i przekazanie reszty fosforanowej do białka regulatorowego PdtA<sub>R</sub>.

Celem pracy doktorskiej było zbadanie udziału histydynowej kinazy PdtA<sub>S</sub> oraz białka regulatorowego PdtA<sub>R</sub> w regulacji wybranych procesów metabolicznych mykobakterii. Aby zbadać, jakie procesy metaboliczne mógłby potencjalnie regulować system PdtA<sub>S</sub>/R w komórkach prątków, w toku niniejszej pracy doktorskiej skonstruowano zmutowane szczepy *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* pozbawione zdolności do syntezy funkcjonalnego białka PdtA<sub>S</sub>.

Aby rozpocząć poszukiwania zmian fenotypowych, związanych z brakiem funkcjonalnej kinazy PdtA<sub>S</sub> w komórkach mykobakterii, wykorzystano mikromacierze fenotypowe firmy BIOLOG oraz szybkoorosnący, niepatogenny szczep *M. smegmatis*. Podobne podejście badawcze jest powszechnie stosowane w badaniach mykobakterii. Wykorzystano je m.in. w celu scharakteryzowania składnika pompy oporności wielolekowej - MSMEG\_2631 (Mmp) [Khatri i wsp. 2013]. Wyniki macierzy fenotypowych dla mutantu pozbawionego funkcjonalnego białka PdtA<sub>S</sub> wykazały zmniejszoną aktywność metaboliczną komórek zmutowanego szczepu w obecności: szerokiego zakresu aminoglikozydów (tobramycyny, sisomycyny, apramycyny, neomycyny, streptomycyny,

amikacyny, gentamycyny), inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transportu elektronów (pentachlorofenolu, menadionu, heksachlorofenu, sangwinaryny i chlorowodoru guanidyny), etionamidu. Wykazano równocześnie, że mutant *ΔpdtA* *M. smegmatis* charakteryzuje się zwiększoną aktywnością metaboliczną w obecności: dihydrostreptomycyny, inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transportu elektronów (kolistyna i fiolet tetrazoliowy), tetracykliny i ryfampicyny. Macierze fenotypowe to metoda przesiewowa, a wyniki uzyskane z ich zastosowaniem wymagają weryfikacji z zastosowaniem innych eksperymentów. Dlatego też, kolejnym etapem pracy była weryfikacja zmienionej aktywności metabolicznej rekombinowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* w obecności aminoglikozydów oraz tetracykliny. Do weryfikacji danych otrzymanych z macierzy fenotypowych wykorzystano klasyczne metody mikrobiologiczne, takie jak: test kropkowy na podłożu stałym zawierającym wybrane stężenia antybiotyków, analizę przeżywalności (CFU/ml) oraz określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC). W wyniku testu kropkowego oraz analizy przeżywalności rekombinowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* wykazano, że zmutowany szczep charakteryzował się zwiększoną wrażliwością na kanamycynę, apramycynę, sisomycynę, streptomycynę oraz dihydrostreptomycynę. Analiza przeżywalności wykazała dodatkowo, że zmutowany szczep cechuje się zwiększoną opornością na tetracyklinę. Ponadto, wykorzystując mikropłytkowy test Alamar Blue określono, że wartość MIC dla szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* była znacząco niższa w obecności kanamycyny, streptomycyny i dihydrostreptomycyny, i wyższa w obecności tetracykliny, w porównaniu do szczepu kontrolnego. W przypadku apramycyny i sisomycyny nie zaobserwowano różnicy wartości MIC między badanymi szczepami. Dla wszystkich antybiotyków z wyjątkiem dihydrostreptomycyny, wyniki uzyskane z macierzy fenotypowych były zgodne z wynikami otrzymanymi za pomocą klasycznych metod mikrobiologicznych (test kropkowy, CFU/ml, MIC). Mikromacierze fenotypowe wykazały, że aktywność metaboliczna zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* jest zwiększona w porównaniu do szczepu kontrolnego, natomiast klasyczne metody mikrobiologiczne wykazały zwiększoną wrażliwość zmutowanego szczepu na dihydrostreptomycynę. Rozbieżności pomiędzy wynikami z mikromacierzy fenotypowych oraz klasycznych metod mikrobiologicznych, można tłumaczyć znacznym zróżnicowaniem aktywności metabolicznej w poszczególnych powtórzeniach w systemie BIOLOG dla dihydrostreptomycyny. Podsumowując, komórki

mutanta *ΔpdtA* *M. smegmatis* charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na aminoglikozydy i zwiększoną opornością na tetracyklinę, antybiotyki oddziałujące na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego [Wilson, 2014]. Kontynuowano zatem badania nad mechanizmem nadwrażliwości komórek szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe. Dotychczas poznano szereg mechanizmów, które mogą powodować nabywanie oporności/wrażliwości bakterii na aminoglikozydy i tetracykliny. Wśród nich są mutacje lub modyfikacje rRNA, jakościowe i ilościowe rearanżacje rybosomu, mechanizm wnikania lub wypompowywania leku z komórki i enzymatyczna inaktywacja antybiotyków. W toku niniejszej pracy doktorskiej testowano zatem najbardziej prawdopodobne hipotezy tłumaczące obserwowane fenotypy.

Biorąc pod uwagę fakt, że PdtA jest antyterminatorem transkrypcji, a synteza i dojrzewanie rybosomalnego RNA są regulowane przez antyterminację, postanowiono zweryfikować hipotezę zakładającą, że szczep *ΔpdtA* ma zaburzony proces antyterminacji rRNA, co wpływa na zmianę jego wrażliwości na antybiotyki wiążące podjednostkę 30S. Antyterminacja w operonach *rrn* występuje wśród wielu gatunków bakterii. Sekwencje antyterminacyjne *boxA*, *boxB*, *boxC* występują również u *M. tuberculosis* i zlokalizowane są poniżej miejsca startu transkrypcji, jak również w ITS [Beuth i wsp. 2005]. Większość gatunków bakterii zawiera wiele operonów *rrn* w swoich genomach. *M. tuberculosis* posiada tylko jeden operon *rrn*, natomiast, *M. smegmatis* posiada dwa operony *rrn* i może kierować ekspresją każdego z nich za pomocą co najmniej 3 różnych promotorów [Gonzalez-y-Merchand i wsp. 1996, Kaczanowska i wsp. 2007]. W niniejszej pracy zastosowano hybrydyzację typu Northern oraz qRT-PCR w celu zbadania poziomów ekspresji prekursorowych i dojrzałych cząsteczek rRNA w zmutowanych komórkach szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis*, jak również w komórkach *M. smegmatis* typu „dzikiego”. Za pomocą analizy Northern i qRT-PCR nie wykazano znaczących zmian w poziomie ekspresji rRNA zmutowanego szczepu. Powyższe wyniki wskazują zatem, że antyterminacja *rrn* nie jest najprawdopodobniej zależna od białka PdtA, a za obserwowaną zwiększoną wrażliwość na antybiotyki aminoglikozydowe odpowiada inny mechanizm.

Biorąc pod uwagę, że miejscem docelowym antybiotyków aminoglikozydowych jest podjednostka 30S rybosomu bakteryjnego, następny etap badań obejmował analizę



rybosomów oraz białek rybosomalnych mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis*, oraz szczepu kontrolnego. Zbadano zatem stosunek podjednostek rybosomalnych 30S/50S w komórkach mutantu i szczepu typu „dzikiego”, i wykazano nadprodukcję podjednostki rybosomalnej 30S w komórkach *ΔpdtA* *M. smegmatis*. Następnie frakcje zawierające podjednostki rybosomalne zostały rozdzielone za pomocą elektroforezy SDS-PAGE i analizowane z wykorzystaniem spektrometrii mas. Metody te pozwoliły na wykazanie, że skład podjednostek rybosomalnych mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis* jest znacząco zmieniony. Zidentyfikowano trzy białka, których ilość była istotnie zwiększona w podjednostce 30S zmutowanego szczepu, były to: dwa czynniki wydłużania translacji TUF i TSF oraz czynnik recyklingu rybosomów RRF. Zwiększona ilość czynników wydłużania translacji oraz czynnika recyklingu rybosomów w podjednostce 30S może sugerować, że recykling rybosomów może zachodzić wydajniej u szczepu mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis*, niż u szczepu typu „dzikiego”. Natomiast, zwiększona ilość współczynników wydłużania translacji TUF i TSF w rybosomach może sugerować, że szybkość translacji w komórkach zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* jest zmieniona, ponieważ obydwie te białka są potrzebne do skutecznej wymiany nukleotydów guaninowych podczas wydłużania łańcucha peptydowego [Jonak i wsp. 1998]. Analiza spektrometrii mas wykazała również, że czynnik inicjacji translacji IF-3 występuje w mniejszej ilości w podjednostce 30S mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis*. Funkcją białka IF-3 u *E. coli* jest stabilizacja poddanej recyklingowi podjednostki 30S, co zapobiega ponownemu połączeniu w 70S [Hirokawa i wsp. 2005]. Wykazano, że na interakcję pomiędzy podjednostką 30S i IF-3 u *M. tuberculosis* wpływają: kanamycyna oraz streptomycyna, zakłócając tym samym inicjację translacji [Chulluncuy i wsp. 2016]. Obniżona ilość białka IF-3 w rybosomach mutantu może wskazywać na to, że podjednostki rybosomalne 30S pozostają w konformacji, co sprzyja hamowaniu translacji przez aminoglikozydy.

Obserwowane zmiany w składzie rybosomu mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis* mogą potencjalnie prowadzić do zmiany szybkości translacji. Aby to zweryfikować, przeprowadzono test wydajności translacji. Z wykorzystaniem testu aktywności β-galaktozydazy wykazano, że wydajność translacji w mutancie *ΔpdtA* *M. smegmatis* jest obniżona. Kiedy analogiczne doświadczenia przeprowadzono dla szczepów hodowanych z dodatkiem antybiotyków aminoglikozydowych, wykazano zmniejszenie wydajności

translacji zarówno u komórek mutantów, jak i typu „dzikiego”, jednak bez istotnych statystycznie różnic pomiędzy szczepami. Natomiast, dodatek tetracykliny do hodowli powodował zmniejszenie wydajności translacji badanych szczepów. Zahamowanie wydajności translacji było skuteczniejsze w przypadku szczepu typu „dzikiego”, niż mutantu *ΔpdtaS M. smegmatis*. Powyższe wyniki wskazują, że brak funkcjonalnego białka PdtaS wpływa na zmniejszenie wydajności translacji oraz, że proces translacji w komórkach *ΔpdtaS M. smegmatis* jest mniej wrażliwy na obecność tetracykliny. Obserwowany efekt wynika prawdopodobnie z modyfikacji w składzie rybosomu mutantu *ΔpdtaS M. smegmatis*. Najprawdopodobniej wiązanie tetracyklin i aminoglikozydów do zmodyfikowanych rybosomów mutantu *ΔpdtaS M. smegmatis* przebiega w sposób odmienny, niż w przypadku szczepu „dzikiego”. Ponadto, zmodyfikowany skład rybosomów mutantu może również częściowo wpływać na ich funkcję, czyniąc prątki bardziej wrażliwymi na niektóre antybiotyki skierowane przeciwko podjednostce 30S.

Badania przesiewowe z wykorzystaniem mikromacierzy fenotypowych ujawniły, że szczep *ΔpdtaS M. smegmatis* charakteryzuje się również zmienioną aktywnością metaboliczną w obecności inhibitorów łańcucha oddechowego oraz transportu elektronów. Potwierdzają to dostępne dane literaturowe opisujące globalną analizę transkryptomów komórek *M. tuberculosis* hodowanych w różnych warunkach środowiskowych i sugeruje związek pomiędzy ekspresją białka PdtaS a dostępnością tlenu. Badania Rustad i wsp. oraz Vilchèze i wsp. wskazują, że ilość transkryptów *pdtaS* była istotnie niższa podczas hipoksji i produkcji NAD<sup>+</sup> w zmutowanym szczepie pozbawionym funkcjonalnego operonu *nadABC* [Rustad i wsp. 2008; Vilchèze i wsp. 2010]. Natomiast badania Sherrid i wsp. wskazują, że ilość transkryptów *pdtaS* wzrasta ponad 6-krotnie w ciągu pierwszych 4 godzin reaeracji [Sherrid i wsp. 2010]. Dane literaturowe wskazują, że wnikanie aminoglikozydów do komórek bakteryjnych wymaga protonowej siły napędowej (PMF). PMF jest generowana przez dehydrogenazę NADH (kompleks I) i dehydrogenazę bursztynianową (kompleks II), podczas przepływu elektronów przez łańcuch oddechowy [Simon i wsp. 2008]. Zmutowany szczep *ΔpdtaS M. smegmatis* charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na antybiotyki aminoglikozydowe. Zasadne jest zatem pytanie: czy białko PdtaS może wpływać na poziom PMF, a tym samym na transport aminoglikozydów przez błonę komórkową?

Wydajność aktywności oddechowej mutantu określono za pomocą testów redukcji Alamar blue oraz TTC. Natomiast, test wnikania streptomycyny przeprowadzono w celu zbadania transportu aminoglikozydów w komórkach mutantu. Nie wykazano istotnych zmian w zdolności redukcji resazury, jako akceptora elektronów w łańcuchu oddechowym przez szczep *ΔpdtaS M. smegmatis*, w porównaniu do szczepu typu „dzikiego”. Test redukcji TTC wykazał niewielki, ale statystycznie istotny spadek tempa redukcji chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazoliowego przez zmutowane komórki w porównaniu do kontroli. Wyniki otrzymane w teście redukcji TTC jak i z macierzy fenotypowych potwierdzają, że białko PdtaS wpływa na funkcjonowanie łańcucha oddechowego. Zatem brak funkcjonalnego białka PdtaS powinien potencjalnie wpłynąć na zmniejszenie poziomu PMF, a co za tym idzie wnikanie aminoglikozydów do komórki. Hipoteza ta jednak nie została potwierdzona, bowiem analiza wnikania streptomycyny do komórek, wykonana z wykorzystaniem komercyjnego testu immunoenzymatycznego ELISA, nie wykazała istotnych różnic w wewnątrzkomórkowym stężeniu streptomycyny pomiędzy szczepem *ΔpdtaS M. smegmatis* a szczepem typu „dzikiego”.

W trakcie przebiegu infekcji *M. tuberculosis* musi radzić sobie z różnymi czynnikami stresowymi generowanymi przez gospodarza, w szczególności z antybakteryjnymi właściwościami makrofagów. Makrofagi wytwarzają przeciwdrobnoustrojowe reaktywne formy tlenu i azotu (ROS i RNS) poprzez oksydazę NADPH i indukowalną syntetazę tlenku azotu. Badania wpływu ROS i RNS na prątki gruźlicy to jedne z podstawowych badań wykonywanych pod kątem wirulencji prątków gruźlicy. Przykładami są badania wykazujące zwiększoną wrażliwość szczepu *ΔdlaT M. tuberculosis* na reaktywne formy azotu [Shi i wsp. 2006] oraz badania wykazujące zwiększoną wrażliwość mutantu *ΔahpC M. tuberculosis* na reaktywne formy tlenu [Master i wsp. 2002]. W toku niniejszej pracy doktorskiej zweryfikowano zatem czy białko PdtaS jest istotnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność prątków w obecności reaktywnych form tlenu lub azotu. Jako generator wolnych rodników tlenowych wykorzystano menadion, natomiast wolnych rodników azotowych DETA/NO. Analiza przeżywalności (CFU/ml) komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*, pozbawionych zdolności do syntezy funkcjonalnego białka PdtaS, hodowanych w obecności DETA/NO lub menadionu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w przeżywalności komórek

w porównaniu do szczepów kontrolnych *mc<sup>2</sup> 155 M. smegmatis* lub *H37Rv M. tuberculosis*. Powyższe dane sugerują, że brak funkcjonalnego białka PdtaS nie wpływa istotnie na proces przeżywalności prątków w obecności reaktywnych form tlenu lub azotu. Powyższe obserwacje mogą tłumaczyć opisany w literaturze brak różnic w przeżywalności szczepu dzikiego oraz mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* podczas infekcji myszy [Parish i wsp., 2003].

Kontynuując poszukiwania funkcji białka PdtaS w komórkach mykobakterii, przeprowadzono globalną analizę transkrypcyjną mutantów  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis*. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że największe zmiany w poziomie transkryptów  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* odnotowano dla genów kodujących: transportery ABC, pompy oporności wielolekowej, białka uczestniczące w farmakokinetyce antybiotyków, białka odpowiedzialne za wirulencję/detoksyfikację oraz białka wchodzące w skład rybosomu. Natomiast analogiczne zmiany dla  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* odnotowano w przypadku transkryptów genów kodujących: białka związane z metabolizmem azotu, pompy oporności wielolekowej, białka uczestniczące w farmakokinetyce antybiotyków, białka odpowiedzialne za wirulencję/detoksyfikację.

Dane uzyskane z globalnej analizy transkryptomów dla komórek mutantów  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* sugerują, że brak funkcjonalnego białka PdtaS może wpływać na zmianę wrażliwości badanych szczepów na antybiotyki. Aby zweryfikować tę hipotezę, określono minimalne stężenie hamujące wzrost szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* dla wybranych tuberkulostatyków. Do testu wybrano następujące związki wykorzystywane w terapii gruźlicy i mykobakterioz: izoniazyd, ryfampicynę, etambutol, ofloksacynę, etionamid, kapreomycynę. Wykazano, że minimalne stężenia hamujące dla izoniazydu i kapreomycyny były ośmiokrotnie wyższe w przypadku szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* w porównaniu do szczepów kontrolnych. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, mechanizm działania kapreomycyny polega na hamowaniu syntezy białek poprzez wiązanie się do jednostki rybosomalnej 70S, która składa się z podjednostek 30S i 50S [Stanley i wsp. 2010]. Za zwiększoną oporność zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na kapreomycynę odpowiada więc najprawdopodobniej zaburzony stosunek ilościowy podjednostki 30S do 50S z nieproporcjonalną akumulacją małej podjednostki, opisany w toku niniejszej pracy. Natomiast, mechanizm działania izoniazydu opiera się na

hamowaniu syntezy kwasów mykolekowych u prątków, a mechanizm związany ze zwiększoną opornością na ten lek u  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* analizowano badając funkcjonowanie pomp oporności wielolekowej, aktywność katalazy oraz przeprowadzając analizę mutacji związanych z nabywaniem oporności na izoniazyd.

Globalna analiza transkryptomów wykazała szereg zmian w poziomie transkryptów genów kodujących pompy oporności wielolekowej dla szczepu w  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*. Aby zweryfikować, czy na zwiększoną oporność zmutowanego szczepu na antybiotyki może mieć wpływ odmienne funkcjonowanie pomp oporności wielolekowej, określono minimalne stężenia hamujące wzrost zmutowanego szczepu przez izoniazyd w obecności inhibitorów pomp oporności wielolekowej (rezerpina, walinomycyna i werapamil). Uzyskane wartości MIC dowodzą, że zwiększona oporność  $\Delta pdtaS$  na izoniazyd nie jest związana z mechanizmami aktywnego wypompowywania leku z komórki przez pompy oporności wielolekowej, na które działają badane inhibitory pomp.

Kolejnym krokiem, mającym na celu weryfikację przyczyn zwiększonej oporności szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na izoniazyd, była analiza najczęściej spotykanych w szczepach klinicznych mutacji związanych z nabywaniem oporności na izoniazyd. W tym celu wykonano analizę sekwencji transkryptów uzyskanych podczas globalnego sekwencjonowania RNA i wykazano, że zwiększona oporność szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na izoniazyd nie wynika z akumulacji mutacji w genach związanych z nabywaniem oporności na ten lek, takich jak: *katG* (katalaza-peroksydaza), *inhA* (reduktaza enoilo-ACP), *ndh* (dehydrogenaza NADH), *ahpC* (reduktaza wodoronadtlenków alkilowych).

Następnym etapem weryfikacji zwiększonej oporności mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na izoniazyd był test aktywności katalazy w komórkach zmutowanego szczepu. Katalaza (KatG) jest enzymem aktywującym izoniazyd w komórce bakteryjnej. Wykazano, że aktywność katalazy w komórkach zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, była trzykrotnie niższa, niż w przypadku komórek szczepu kontrolnego. Niższa aktywność katalazy w komórkach mutantu wpływa na niższy stopień aktywacji proleku, jakim jest izoniazyd, co stanowi potencjalne wyjaśnienie przyczyny zwiększonej oporności mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na izoniazyd.

Podsumowując, kluczową cechą odpowiedzialną za zmienioną wrażliwość zmutowanego szczepu *ΔpdtA* *M. smegmatis* na antybiotyki oddziałujące na podjednostkę 30S rybosomu, jest skład rybosomu i/lub związane z nim zmiany konformacyjne. Natomiast mechanizmem odpowiedzialnym za zwiększoną oporność mutantu *ΔpdtA* *M. smegmatis* na izoniazyd jest zmniejszona aktywność katalazy w zmutowanym szczepie. Przedstawione mechanizmy mogłyby zostać w przyszłości wykorzystane w czasie terapii gruźlicy poprzez zwiększenie podatności prątków na antybiotyki w wyniku jednoczesnego zastosowania inhibitorów PdtA. Jest to szczególnie istotne, ponieważ streptomycyna, kanamycyna, izoniazyd i kapreomycyna są lekami stosowanymi w leczeniu lekoopornej gruźlicy.

## 7. Wnioski

- Brak funkcjonalnej kinazy histydynowej PdtaS u mykobakterii zaburza skład podjednostki 30S rybosomów wpływając na wrażliwość prątków na aminoglikozydy oraz tetracyklinę.
- Inaktywacja genu *pdtaS* *M. smegmatis* powoduje zwiększenie oporności na izoniazyd poprzez obniżenie aktywności katalazy niezbędnej do aktywacji proleku w komórkach prątków.

Powyższe wnioski wyciągnięto na podstawie następujących obserwacji:

1. Białko PdtaS jest zdolne do autofosforylacji i przekazania reszty fosforanowej do białka PdtaR.

2. Białko PdtaS nie jest niezbędne dla wzrostu mykobakterii w standardowych podłożach mikrobiologicznych.

3. Obecność reaktywnych form azotu lub tlenu w podłożu nie wpływa na przeżywalność komórek zmutowanych szczepów *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego białka PdtaS.

4. Komórki zmutowanego szczepu *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnego białka PdtaS charakteryzują się zmienioną wrażliwością na antybiotyki oddziałujące na podjednostkę 30S rybosomu bakteryjnego.

5. Wykazano zmianę stosunku ilościowego podjednostki 30S do 50S z nieproporcjonalną akumulacją małej podjednostki w komórkach zmutowanego szczepu *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego białka PdtaS.

6. Komórki zmutowanego szczepu *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnego białka PdtaS charakteryzują się zwiększoną opornością na izoniazyd.

7. Wykazano istotnie zmniejszoną aktywność katalazy w zmutowanych komórkach *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego białka PdtaS

## 8. Streszczenie

Białko PdtaS jest elementem dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału (TCS) PdtaR/PdtaS. Funkcją sensorowej kinazy PdtaS jest autofosforylacja i przekazanie reszty fosforanowej do białka regulatorowego PdtaR. Skuteczne działanie TCSs u *Mycobacterium tuberculosis* jest kluczowe dla efektywnego i szybkiego reagowania na zmieniające się warunki środowiska. Ta zdolność prątków wydaje się być kluczową dla przetrwania tych bakterii podczas infekcji.

Celem niniejszej pracy było zbadanie udziału histydynowej kinazy PdtaS oraz białka regulatorowego PdtaR w regulacji wybranych procesów metabolicznych mykobakterii.

Pierwszy etap pracy obejmował konstrukcję metodą knock-out zmutowanych szczepów *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego białka PdtaS. Skonstruowany szczep  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* został następnie poddany analizie cech fenotypowych, wykorzystując technologię mikromacierzy fenotypowych. Zaobserwowano zmienioną aktywność metaboliczną komórek szczepu  $\Delta pdtaS$  w obecności antybiotyków aminoglikozydowych, tetracykliny oraz inhibitorów oddychania, oraz transportu elektronów błonowych. Zmienioną wrażliwość zmutowanego szczepu potwierdzono z wykorzystaniem klasycznych metod mikrobiologicznych: test kropkowy na podłożu stałym zawierającym wybrane stężenia antybiotyków, analizę przeżywalności (CFU/ml) oraz określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC).

Następnie potwierdzono wpływ braku funkcjonalnego genu *pdtaS* na funkcjonowanie łańcucha oddechowego. Wykazano niewielkie, ale istotne statystycznie zmniejszenie redukcji bezbarwnego TTC do czerwonego TPF (1,3,5-tri phenylformazan) przez szczep  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*. Natomiast test wnikania streptomycyny do komórek zmutowanego szczepu nie wykazał istotnych statystycznie różnic.

Kolejnym etapem była analiza poziomu ekspresji rRNA w komórkach mutantu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Northern oraz qRT-PCR. Obydwie metody nie wykazały znaczących zmian w poziomie ekspresji rRNA.



Rozdział rybosomów w gradiencie sacharozy wykazał zmianę stosunku ilościowego 30S do 50S z nieproporcjonalną akumulacją małej podjednostki w mutancie pozbawionym funkcjonalnego genu *pdtaS* *M. smegmatis*. Z wykorzystaniem spektrometrii mas zaobserwowano różnice ilościowe w składzie białek rybosomalnych mutantu w stosunku do szczepu kontrolnego. Następnie wykonano test wydajności translacji, aby zweryfikować, czy zmiany w składzie rybosomu mutantu mogą potencjalnie prowadzić do zmiany szybkości translacji. Wykazano, że wydajność translacji określona poprzez pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy była obniżona w mutancie  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*.

Dane uzyskane z globalnej analizy transkryptomów dla komórek rekombinowanych szczepów  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* oraz  $\Delta pdtaS$  *M. tuberculosis* sugerują, że brak funkcjonalnego białka PdtaS może wpływać na zmianę wrażliwości badanych szczepów na antybiotyki. Aby zweryfikować te wyniki, określono minimalne stężenie hamujące wzrost zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* dla wybranych tuberkulostatyków i wykazano zwiększoną oporność zmutowanego szczepu na izoniazyd. Następnie, wykazano, że aktywność katalazy w komórkach zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis*, była trzykrotnie niższa, niż w przypadku komórek szczepu kontrolnego. Stanowi to wyjaśnienie przyczyny zwiększonej oporności zmutowanego szczepu  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* na izoniazyd.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że brak funkcjonalnego białka PdtaS wpływa na funkcjonowanie łańcucha oddechowego i skład rybosomów powodując istotne zmiany w oporności na antybiotyki ukierunkowane na rybosom, które są stosowane w leczeniu zakażeń prątkami. Ponadto brak funkcjonalnego białka PdtaS powoduje zmniejszenie aktywności katalazy w komórkach prątków, co skutkuje zwiększeniem oporności na izoniazyd.

## 9. Abstract

PdtaS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is part of a two component signal transduction system PdtaR/PdtaS. It acts as the sensor kinase. PdtaS can self-phosphorylate and subsequently transfer the phosphoryl group to a response regulator PdtaR (Rv1626). Effective action of TCSs in *Mycobacterium tuberculosis* is essential for the effective and rapid response to changing environmental conditions. This ability of mycobacteria to adapt to the environment seems to be crucial for the pathogenicity of tubercle bacilli.

The aim of the project is to identify the role of PdtaS histidine kinase and PdtaR response regulator of *Mycobacterium tuberculosis* in the regulation of some metabolic processes of mycobacteria.

Using two step recombination protocol by Parish and Stocker the *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* defined mutant strains lacking a functional *pdtaS* gene were constructed. The resulting  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* strain was tested using Phenotype Microarray screening system. Changed metabolic activity of  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* strain cells in the presence of aminoglycoside antibiotics, tetracycline and respiratory inhibitors and membrane electron transport was observed. The antibiotic sensitivity profiles were confirmed by classical microbiological methods: spot dilution assay on a solid medium containing selected concentrations of antibiotics, survival analysis (CFU / ml) and minimal inhibitory concentration (MIC).

Next, the effect of the lack of the functional *pdtaS* gene on the functioning of the respiratory chain was confirmed. It showed a slight but statistically significant decrease in the reduction of a colorless TTC to a red TPF (1,3,5-tri phenylformazan) by the  $\Delta pdtaS$  *M. smegmatis* strain. In contrast, the uptake of streptomycin into the cells of the mutated strain did not show any statistically significant differences.

The next step was the analysis of rRNA expression level in *M. smegmatis*  $\Delta pdtaS$  mutant cells using Northern Blotting analysis and qRT-PCR. Both methods did not show any significant changes in the rRNA expression level.

The sucrose gradient for ribosome separation showed a change in the 30S to 50S quantitative ratio with a disproportionate accumulation of a small subunit in a mutant without the functional gene *ΔpdtaS M. smegmatis*. Quantitative differences in the composition of ribosomal proteins of the mutant in relation to the control strain were observed using mass spectrometry. Then a translation efficiency test was performed to verify whether changes in the composition of the mutant ribosome could potentially lead to a change in the translation rate. It was shown that the translation efficiency measured as  $\beta$ -galactosidase activity was reduced in the mutant *ΔpdtaS M. smegmatis*.

Data obtained from the global analysis of transcriptomes for mutant cells of *M. smegmatis ΔpdtaS* and *M. tuberculosis ΔpdtaS* strains suggest that the lack of functional PdtaS protein may affect the change of sensitivity of the tested strains to antibiotics. To verify these results, the minimal concentration inhibiting the growth of the *M. smegmatis ΔpdtaS* mutant strain was determined for selected tuberculostatics. Increased resistance of the mutated strain to isoniazid was demonstrated. Then, it was shown that the catalase activity in the cells of the *M. smegmatis ΔpdtaS* mutant strain was three times lower than in the cells of the control strain. This explains the cause of the increased resistance of the *ΔpdtaS M. smegmatis* mutant strain to isoniazid.

The obtained results show that the lack of functional PdtaS protein affects the functioning of the respiratory chain and the composition of ribosomes causing significant changes in resistance to ribosome-targeted antibiotics used in the treatment of mycobacterial infections. Moreover, the lack of functional PdtaS protein causes a decrease in the activity of catalase in mycobacteria cells, which increases isoniazid resistance.

## 10. Literatura

1. Ahuja S.D., Ashkin D. i wsp. (2012) Multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. *PLoS Med.* 9(8):e1001300.
2. Antczak M., Dadura K. i wsp. (2017) Prątki niegruźlicze - dlaczego tak trudno leczyć mykobakteriozy? *KOSMOS* 66(1): 31-40.
3. Arnvig K. B., Pennell S. i wsp. (2004) A high-affinity interaction between NusA and the *rrn* nut site in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101,8325–8330.
4. Bagieńska M., Rzewuska M. (2010) Występowanie prątków z kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* u zwierząt – transmisja wybranych gatunków między ludźmi a zwierzętami. *Życie Weterynaryjne*, 85(9):742-746.
5. Banfi E., Scialino G. i wsp. (2003) Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J.Antimicrob. Chemother.* 52,796–800.
6. Beuth B., Pennell S. i wsp. (2005) Structure of a *Mycobacterium tuberculosis* NusA – RNA complex. *EMBOJ.* 24,3576–3587.
7. Bhattacharya M., Das A.K. (2011) Inverted repeats in the promoter as an autoregulatory sequence for TcrX in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 415:17–23.
8. Bretl D. J., Demetriadou C. i wsp. (2011) Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75(4): 566-582.
9. Bretl D.J., He H. i wsp. (2012) MprA and DosR coregulate a *Mycobacterium tuberculosis* virulence operon encoding Rv1813c and Rv1812c. *Infect Immun* 80:3018–3033.
10. Burian J., Ramon-Garcia S. i wsp. (2012) The mycobacterial transcriptional regulator *whiB7* gene links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance. *J Biol Chem.* 287(1):299–310

11. Chambers H.F., Moreau D. i wsp. (1995) Can penicillins and other  $\beta$ -lactam antibiotics be used to treat tuberculosis? *Antimicrob Agents Chemother.* 39(12):2620–2624
12. Chen W., Biswas T. i wsp. (2011) Unusual regioversatility of acetyltransferase Eis, a cause of drug resistance in XDR-TB. *Proc Natl Acad Sci USA.*108(24):9804–9808.
13. Chulluncuy R., Espiche C. i wsp. (2016) Conformational response of 30S-bound IF3 to A-Site Binders Streptomycin and Kanamycin. *Antibiotics (Basel)* 5:E38.
14. Dadura K., Plocinska R. i wsp. (2017) PdtA Deficiency Affects Resistance of Mycobacteria to Ribosome Targeting Antibiotics. *Front Microbiol* 8: 2145
15. Dookie N., Rambaran S. i wsp. (2018) Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *J Antimicrob Chemother.* May 1;73(5):1138-1151.
16. Ewann F., Jackson M. i wsp. (2002) Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 70:2256–2263.
17. Fang H. i wsp. (2013) The LuxR family regulator Rv0195 modulates Mycobacterium tuberculosis dormancy and virulence. *Tuberculosis (Edinb)* 93(4)
18. Ferber D. (2005) Biochemistry. Protein that mimics DNA helps tuberculosis bacteria resist antibiotics. *Science.* 308(5727)
19. Fu L. M., Shinnick T. M. (2007) Genome-wide exploration of the drug action of capreomycin on *Mycobacterium tuberculosis* using Affymetrix oligonucleotide GeneChips. *J. Infect.* 54, 277–284.
20. Franzblau S. G., Witzig R. S. i wsp. (1998) Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J.Clin.Microbiol.*36,362–366.
21. Galperin M.Y. (2006) Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations. *J Bacteriol.* Jun; 188(12): 4169–4182.
22. Garton N.J., Waddell S.J. i wsp. (2008) Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum. *PLoS Med.* 5(4):e75

23. Gao L.Y., Laval F. i wsp. (2003) Requirement for *kasB* in *Mycobacterium mycolic* acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol Microbiol.* 49(6):1547–1563
24. Gengenbacher M., Kaufmann S.H. (2012) *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 36(3):514–532.
25. Gonzalez-y-Merchand J. A., Colston M. J. i wsp. (1996) The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes. *Microbiology*142(Pt3),667–674.
26. Freeman Z.N., Dorus S. i wsp. (2013) The KdpD/KdpE two-component system: integrating K<sup>+</sup> homeostasis and virulence. *PLoS Pathog.* Mar;9(3):e1003201
27. Gagala I., Izydorczyk K. i wsp. (2014). Role of environmental factors and toxic genotypes in the regulation of microcystins-producing cyanobacterial blooms. *Microb. Ecol.*67,465–479.
28. Galperin M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol.* Apr;13(2):150-159.
29. Gangadharam P., Jenkins P. (1998) *Mycobacteria: basis aspect*, Chapman and Hall Medical Microbiology series. Internat.Thomson.Publish.
30. Ghosh A., Tousif S. i wsp. (2013) Expression of the ARPC4 subunit of human Arp2/3 severely affects mycobacterium tuberculosis growth and suppresses immunogenic response in murine macrophages. *PLoS One.* Jul 22;8(7):e69949
31. Gillespie S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 267–74.
32. Gonzalo A. J., Maia C. i wsp. (2006) The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* Jan 20;281(3):1313-6
33. Griffith D.E., Aksamit T. i wsp. (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* Feb 15;175(4):367-416.
34. Habib Z., Xu W. i wsp. (2017) Adaptive gene profiling of *Mycobacterium tuberculosis* during sub-lethal kanamycin exposure. *Microb. Pathog.* 112, 243–253.

35. Haydel S.E., Benjamin W.H. i wsp. (2002) Expression, autoregulation, and DNA binding properties of the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator. *J Bacteriol* 184:2192–2203.
36. Haydel S. E., Clark-Curtiss J. E. (2004) Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 341–347
37. Haydel S.E., Malhotra V. i wsp. (2012) The *prxAB* two-component system is essential for *Mycobacterium tuberculosis* viability and is induced under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol.* 2012 Jan;194(2):354-61.
38. Hartkoorn R.C., Sala C. i wsp. (2012) Genome-wide definition of the SigF regulon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiology* 194(8):2001-9.
39. Hegde S.S., Vetting M.W. I wsp. (2005) A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science.* 308(5727):1480–1483.
40. Hernández-Garduño E., Elwood R. K. (2010) Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1047.
41. Hirokawa G., Nijman R. M. i wsp. (2005) The role of ribosome recycling factor in dissociation of 70S ribosomes into subunits. *RNA* 11, 1317–1328.
42. Hoefsloot W., van Ingen J. i wsp. (2013) The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* Dec;42(6):1604-13.
43. Jagielski T., Augustynowicz-Kopeć E. i wsp. (2010a) Epidemiologia gruźlicy w perspektywie świata, Europy i Polski. *Wiad. Lek.* 63, 230-246
44. Jagielski T., Augustynowicz-Kopeć E. i wsp. (2010b) Epidemiologia gruźlicy lekoopornej: świat – Europa - Polska. *Wiad. Lek.* 64, 345357.
45. Jagielski T., Ignatowska H. i wsp. (2014) Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS One* 9, e100078
46. Jagielski T. (2017) Lekooporność w gruźlicy – aspekty mikrobiologiczne i kliniczne. *Kosmos.* 66 (1), 41-58
47. James J. N., Hasan Z. U. i wsp. (2012) Deletion of *SenX3-RegX3*, a key two-component regulatory system of *Mycobacterium smegmatis*, results in growth defects under phosphate-limiting conditions. *Microbiology* 158, 2724–2731

48. Jenkins, V. A., Robertson B.D. i wsp. (2012) Aspartate D48 is essential for the GlnR-mediated transcriptional response to nitrogen limitation in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* 330(1): 38-45
49. Johansen S.K., Maus C.E. i wsp.. (2006) Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-*O*-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell*. 23(2):173–182.
50. Jonak J., Anborgh P. H. i wsp. (1998) Interaction of EF-Tu with EF-Ts: substitution of His-118 in EF-Tu destabilizes the EF-Tu x EF-Ts complex but does not prevent EF-Ts from stimulating the release of EF-Tu-bound GDP. *FEBS Lett*. 422,189–192.
51. Jung K., Fried L. i wsp. (2012) Histidine kinases and response regulators in networks. *Curr Opin Microbiol* 15:118–124.
52. Kaczanowska M., Ryden-Aulin M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 477–494.
53. Karakousis P. C., Williams E. P. i wsp. (2008) Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 323–331.
54. Karimova, G, Ullmann A. i wsp. (2000) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 328,59–73.
55. Khatri B., Fielder M. i wsp. (2013) High throughput phenotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains' metabolism using biologic phenotype microarrays. *PLOS ONE*8:e52673.
56. Konopska B., Warwas M. (2007) Molekularne aspekty nefrotoksyczności antybiotyków aminoglikozydowych. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 61: 511-518.
57. Kuron A., Korycka-Machala M. i wsp. (2014) Evaluation of DNA primase DnaG as a potential target for antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.*58(3):1699-706.
58. Leonard B., Coronel J. i wsp. (2008) Inter- and intra-assay reproducibility of microplate Alamar blue assay results for isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ciprofloxacin, and capreomycin drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*46,3526–3529.
59. Lewis K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:107–131



60. Machado D., Couto I. i wsp. (2012) Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One 7, e34538
61. Malm S., Tiffert Y. i wsp. (2009) The roles of the nitrate reductase NarGHJI, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology 155(Pt 4):1332-9.
62. Malhotra V., i Agrawal R. i wsp. (2015) Mycobacterium tuberculosis Response Regulators, DevR and NarL, Interact in Vivo and Co-regulate Gene Expression during Aerobic Nitrate Metabolism. J Biol Chem. Mar 27; 290(13): 8294–8309.
63. Marszalek M., Planas A. i wsp. (2014) Two-Component Systems of *Mycobacterium tuberculosis* as potential targets for drug development. AFINIDAD LXXI. 567: 172-178.
64. Master S., Springer B. i wsp. (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *ahpC* in resistance to peroxy nitrite and stage-specific survival in macrophages. Microbiology 148, 3139–3144.
65. Merker M., Kohl T.A. i wsp. (2013) Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. PLoS One. 8: e82551.
66. Mitchison D., Davies G. (2012) The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 16, 724-732
67. Morris R. P., Nguyen L. i wsp. (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Aug 23;102(34):12200-5
68. Morth J.P., Gosmann S. i wsp. (2005) A novel two-component system found in *Mycobacterium tuberculosis*. FEBS Lett. 1;579(19):4145-8.
69. Morris R.P., Nguyen L. i wsp. (2005) Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 102(34):12200–12205
70. Nguyen L., Chinnapapagari S. i wsp. (2005) FbpA-Dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol. 187(19):6603–6611.
71. Nguyen H. T., Wolff K. A. i wsp. (2010) A lipoprotein modulates activity of the MtrAB two-component system to provide intrinsic multidrug resistance,

- cytokinetic control and cell wall homeostasis in *Mycobacterium*. *Mol Microbiol* 76:, 348—364
72. Nguyen L. (2016) Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. *Arch Toxicol.* Jul;90(7):1585-604.
  73. Nowak E., Panjikar S. i wsp. (2006) Structural and functional aspects of the sensor histidine kinase PrrB from *Mycobacterium tuberculosis*. *Structure* 14:275–285.
  74. O’Sullivan D. M., Hinds J. i wsp. (2008). *Mycobacterium tuberculosis* DNA repair in response to subinhibitory concentrations of ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 1199–1202.
  75. Palomino J.C., Martin A. (2014) Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics (Basel)* 3: 317–40.
  76. Parish T., Stoker N.G. (2000) Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology*, 146(8):1969-1975.
  77. Parish T., Stocker N. G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* protocols. *Methods in molecular medicine*. Humana press.
  78. Parish T., Smith D.A. i wsp. (2003) Deletion of Two-Component Regulatory Systems Increases the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 71(3): 1134–1140.
  79. Parish T. (2014) Two-Component Regulatory Systems of *Mycobacteria*. *Microbiol Spectr.* 2014 Feb;2(1).
  80. Pawelczyk J., Brzostek A. i wsp. (2011) AccD6 ,a key carboxyltransferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain.*J.Bacteriol.*193,6960–6972.
  81. Pfyffer G.E. (2007) *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. *Manual of Clinical Microbiology.* 9:543-572
  82. Plocinska R., Purushotham G. i wsp. (2012) Septal localization of the *Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase promotes MtrA regulon expression. *J. Biol. Chem.* 287, 23887–23899.
  83. Plocinska R., Martinez L. i wsp. (2014) *Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase interactions with FtsI and Wag31 proteins reveal a role for MtrB distinct from that regulating MtrA activities. *J Bacteriol.* 196(23):4120-9.

84. Philalay J.S., Palermo C.O. i wsp. (2004) Genes required for intrinsic multidrug resistance in *Mycobacterium avium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3412–3418.
85. Plocinski P., Laubitz D. i wsp. (2014) Identification of protein partners in mycobacteria using a single-step affinity purification method. *PLOS ONE* 9:e91380.
86. Rajagopalan M., Dziedzic R. i wsp. (2010) Mycobacterium tuberculosis origin of replication and the promoter for immunodominant secreted antigen 85B are the targets of MtrA, the essential response regulator. *J Biol Chem* 285; 15816-15827
87. Ramesh A., DebRoy S. i wsp. (2012) The Mechanism for RNA Recognition by ANTAR Regulators of Gene Expression. *PLoS Genet* 8(6): e1002666.
88. Rifat P., Karakousis P.C. (2014) Differential regulation of the two-component regulatory system senX3-regX3 in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology.* Jun; 160(Pt 6): 1125–1133.
89. Robertson D., Carroll P. i wsp. (2007) Rapid recombination screening to test gene essentiality demonstrates that pyrH is essential in Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis* 87:450–458.
90. Rose G., Cortez T. i wsp. (2013) Mapping of Genotype–Phenotype Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by Sequence-Based Transcriptional Profiling. *Genome Biology and Evolution* 5(10): 1849–1862
91. Rubio-Reyes P., Parlane N.A. i wsp. (2017) Immunological properties and protective efficacy of a single mycobacterial antigen displayed on polyhydroxybutyrate beads. *Microb Biotechnol.* Nov;10(6):1434-1440.
92. Rustad T. R., Harrell M. I. i wsp. (2008) The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 3:e1502.
93. Sambrook J., Fritsch E. F. i wsp. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor.
94. Sarkar M.K., Paul K. i wsp. (2010) Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 18;107(20):9370-9375.
95. Scorpio A., Zhang Y. (1996) Mutations in pncA, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996;2(6):662–667.

96. Simon J., Van Spanning R. J. i wsp. (2008) The organisation of proton motive and non-proton motive redox loops in prokaryotic respiratory systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1480–1490.
97. Sharma S. K., Mohan A. (2006) Multidrug-resistant tuberculosis. A menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* 130, 261-272
98. Shasmal M., Sengupta J. (2012) Structural diversity in bacterial ribosomes: mycobacterial 70S ribosome structure reveals novel features. *PLOS ONE* 7:e31742.
99. Sherrid A. M., Rustad T. R. i wsp. (2010) Characterization of a Clp protease gene regulator and the reaeration response in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE* 5:e11622.
100. Shi S., Ehrt S. (2006) Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect. Immun.* 74, 56–63.
101. Shrivastava R., Ghosh A.K. i wsp. (2009) Intra- and intermolecular domain interactions among novel two-component system proteins coded by Rv0600c, Rv0601c and Rv0602c of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. Mar;155(Pt 3):772-9
102. Singh A., Mai D. i wsp. (2006) Dissecting virulence pathways of *Mycobacterium tuberculosis* through protein-protein association. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11346–11351.
103. Sivaramakrishnan S., de Montellano P.R. (2013) The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors (Basel)* 3(3):259-282.
104. Sousa E.H.S., Tuckerman J.R. i wsp. (2007) DosT and DevS are oxygen-switched kinases in *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* 16:1708–1719.
105. Stanley R.E., Blaha G. i wsp. (2010) The structures of the anti-tuberculosis antibiotics viomycin and capreomycin bound to the 70S ribosome. *Nat Struct Mol Biol.* Mar;17(3):289-93.
106. Stephan J., Mailaender C. i wsp. (2004) Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(11):4163–4170.
107. Szczesny R.J., Borowski L.S. i wsp. (2010) Human mitochondrial RNA turnover caught in flagranti: involvement of hSuv3p helicase in RNA surveillance. *Nucleic Acids Res.* 38,279–298

108. Taber H. W., Mueller J. P. i wsp. (1987) Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* 51, 439–457
109. Tremblay L.W, Fan F. i wsp. (2010) Biochemical and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -lactamase with the carbapenems ertapenem and doripenem. *Biochemistry.* 49(17):3766–3773.
110. Triccas J.A., Parish T. i wsp. (1998) An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 167(2):151-156.
111. Ulrich L.E., Koonin E.V. i wsp. (2005) One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 13, 52–56
112. Van Der Werf M. J., Ködmön C. i wsp. (2014) Drug resistance among tuberculosis cases in the European Union and European Economic Area, 2007 to 2012. *Euro Surveill.* 19, e20733.
113. Vilcheze C., Av-Gay Y. i wsp. (2008) Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 69(5):1316–1329.
114. Vilchèze C., Weinrick B. i wsp. (2010) NAD<sup>+</sup>auxotrophy is bacteriocidal for the tubercle bacilli. *Mol. Microbiol.* 76, 365–377.
115. Viveirosa M., Martins M. i wsp. (2012) Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 10(9):983–998.
116. West A.H., Stock A.M. (2011) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends.Biochem. Sci.* 26, 369–376 (2001)
117. Wiegand I., Hilpert K. i wsp. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163–175.
118. Williams K.J., Joyce G. i wsp. (2010) Improved mycobacterial tetracycline inducible vectors. *Plasmid*, 64(2):69-73.
119. Williams K. J., Jenkins V. A. (2015) Deciphering the metabolic response of *Mycobacterium tuberculosis* to nitrogen stress. *Mol Microbiol* 97(6): 1142-1157.
120. Wilson D. N. (2014) Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 35–48.

121. Wolanin P.M., Thomason P.A. i wsp. (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* 3:3013.3011–3013.3018.
122. World Health Organization. (2017) Global tuberculosis report 2017. WHO Report, WHO, 2018, Geneva.
123. Zahrt T.C., Deretic V. (2000) An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* (13):3832-8. doi: 10.1128/JB.182.13.3832-3838.2000
124. Zahrt T.C., Deretic V. (2001) *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12706–12711.
125. Zaunbrecher M.A., Sikes R.D. i wsp. (2009) Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(47):20004–20009.
126. Zhou L., Yang L. i wsp. (2015) Transcriptional and proteomic analyses of two-component response regulators in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 46 (1) 73–81. 10.1016