

Ewelina Błaszczuk - Stacjonarne Studia Doktoranckie Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

## **Poli(A) polimeraza PAPI jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych leków przeciwgruźliczych**

### **Streszczenie:**

*Mycobacterium tuberculosis* to najgroźniejszy bakteryjny patogen człowieka odpowiedzialny w skali globalnej za 1,5 mln przypadków śmiertelnych każdego roku. Z drugiej strony gruźlica wywołana przez lekowrażliwe szczepy *M. tuberculosis* jest chorobą w pełni uleczalną choć wymagającą przeprowadzenia aż sześciomiesięcznej terapii z równoczesnym stosowaniem w początkowej fazie (2 miesiące) „koktajlu” czterech a następnie 2 leków przeciwprątkowych. Niezwykle istotnym problemem epidemiologicznym stają się prątki gruźlicy odporne na leki, szczepy wielolekooporne, o rozszerzonej lekooporności czy wręcz odporne na wszystkie znane dotychczas tuberkulostatyki. Wywołana przez te szczepy wielolekooporna gruźlica, identyfikowana w wielu krajach na całym świecie, stanowi o konieczności poszukiwania nowych skutecznych leków przeciwgruźliczych, które pozwoliłyby na efektywniejsze leczenie gruźlicy lekowrażliwej oraz umożliwiły efektywne leczenie gruźlicy wielolekoopornej. Ograniczona liczba miejsc docelowych w komórkach prątków gruźlicy rozpoznawanych przez stosowane obecnie leki przeciwprątkowe wskazuje na konieczność poszukiwania alternatywnych tarcz molekularnych dla leków przeciwprątkowych nowej generacji. Nowych miejsc docelowych dla potencjalnych leków przeciwprątkowych należy poszukiwać wśród białek niezbędnych dla przeżycia *M. tuberculosis* w warunkach *in vitro* i/lub w zakażonym organizmie. Wśród genów wskazywanych jako niezbędne do wzrostu prątków gruźlicy, zidentyfikowanych w badaniach przesiewowych z wykorzystaniem mutagenезy transpozonowej, znalazł się gen *pcnA* kodujący homolog białka poli(A) polimerazy (PAPI) z *E. coli*. Poliadenylaza PAPI odpowiedzialna jest za syntezę sekwencji poli(A) na 3' końcu transkryptów zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Uważa się, że poli(A) polimeraza uczestniczy w globalnej regulacji poziomu transkryptów w komórce.

Głównym celem niniejszej pracy była molekularna ocena możliwości wykorzystania produktu genu *pcnA* jako potencjalnego miejsca docelowego dla nowych leków przeciwgruźliczych oraz jego charakterystyka funkcjonalna u mykobakterii. Realizacja celu pracy nastąpiła poprzez ocenę niezbędności PAPI w komórkach prątków oraz uzyskanie

warunkowego mutantu *M. smegmatis* charakteryzującego się obniżoną ekspresją białka PAPI. Ponadto uzyskano rekombinowane białko PAPI i opracowano test enzymatyczny pozwalający na ocenę jego aktywności, również w obecności potencjalnych inhibitorów. Zarówno w komórkach bakteryjnych jak i w warunkach *in vitro* wykazano bezpośrednie interakcje białka PAPI z białkami systemu naprawy DNA poprzez łączenie niehomologicznych końców (NHEJ) oraz zmapowano miejsca wiązania pomiędzy badanymi białkami. Ponadto wykazano zdolność wiązania mykobakteryjnego białka PAPI do jedno- i dwuniciowego DNA oraz do tworzenia kompleksów PAPI z białkiem Ku na podwójnej nici DNA. Analizy mutantu *M. smegmatis* charakteryzującego się obniżonym poziomem ekspresji białka PAPI wykazały jego zwiększoną wrażliwość na wybrane czynniki mutagenne takie jak: promieniowanie UV, chlorowodorek hydroksyloaminy oraz mitomycyna C.

Uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej wyniki wskazują, iż mykobakteryjne białko PAPI posiada aktywność poli(A) polimerazy, jest niezbędne do wzrostu mykobakterii w warunkach *in vitro* i może być rozważane jako miejsce docelowe dla nowych leków przeciwpłatkowych. Opracowany test aktywności poliadenylazy *in vitro*, oraz uzyskany rekombinowany szczep *M. smegmatis* o obniżonym poziomie ekspresji białka PAPI, stanowią model genetyczny do weryfikacji potencjalnych inhibitorów mykobakteryjnej poli(A) polimerazy. Uzyskane wyniki wskazują również na zaangażowanie białka PAPI w procesach naprawy DNA u prątków.

Biorczyk

## Poly(A) polymerase PAPI as a putative target for new antituberculosis drugs

### Summary:

Tuberculosis, a common infectious bacterial disease, is the second leading cause of mortality due to singular infectious agents, worldwide. Despite the widely available medical treatment tuberculosis remains a global pandemic, killing 1,5 million people annually. This is a consequence of the multi-drug resistance (including extensively-drug resistance and totally-drug resistance), lack of effective vaccines and the phenomenon of HIV-TB co-infection. The increasing incidence of multidrug resistant and totally drug resistant tuberculosis is becoming a significant challenge in the process of eradication of the bacterium from human population using currently available drugs. The development of novel alternative medical strategies, new drugs and the search for optimal drug targets are the top priority areas of tuberculosis research.

The main goal of this project was a comprehensive evaluation of poly(A) polymerase (PAPI) as a target for new antimycobacterial drugs.

In the course of experiments it was shown that *pcnA* encoding poly(A) polymerase cannot be inactivated in mycobacteria, with the exception of the merodiploid strains carrying an additional intact copy of the gene integrated into the genomic DNA. The conditional mutant of *M. smegmatis* with chemically inducible expression of the PAPI protein was used to study the physiological effect of depletion of the investigated protein. The down-regulation of PAPI in *M. smegmatis* affected its growth and sensitivity to DNA damaging assaults. The PAPI protein was also expressed in *E. coli* and purified to confirm its polyadenylase activity in vitro and to verify the inhibiting effect of the selected compounds. The purified protein was able to bind in vivo and in vitro to DNA repair proteins of non-homologous end joining pathway (NHEJ), ATP-dependent ligase LigD and DNA bridging protein Ku. The set of in vitro and in vivo experiments allowed to localize within the investigated proteins the sites of interactions. It was also shown by EMSA assay that PAPI protein is able to bind to single and double strand DNA substrates.

The obtained results shown that PAPI is an essential poly(A) polymerase in mycobacteria and may be consider as a target for new antitubercular drugs. The in vitro

polyadenylase activity assay developed here, as well as the conditional *M. smegmatis* mutant with downregulated expression of PAPI, might be applied to verify the potential of a putative poly(A) polymerase inhibitors. The collected data strongly suggest an involvement of mycobacterial PAPI in the DNA repair process.

Bozup