

Streszczenie w języku polskim

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

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

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

Mutanty $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* poddano wstępnej analizie polegającej na ocenie wzrostu i przeżywalności szczepów w obecności reaktywnych form tlenu i azotu generowanych przez menadion i DETA-NO. Badania te wykazały, że mutant $\Delta rv0195$ hodowany z rodnikami nie wykazuje różnic w kinetyce wzrostu i żywotności w stosunku do szczepu dzikiego, jednakże hodowany bez związków charakteryzuje się osłabioną

przeżywalnością w stacjonarnej fazie wzrostu oraz opóźnionym tworzeniem się kolonii na podłożu stałym. Mutant $\Delta rv0260c$ wykazał natomiast znacząco wyższą żywotność w obecności menadionu, porównując badany parametr między mutantem a szczepem dzikim hodowanym w takich samych warunkach.

W kolejnych badaniach, dwiema metodami oceniono wrażliwość szczepów $\Delta rv0195$ i $\Delta rv0260c$ *M. tuberculosis* na wybrane tuberkulostatyki oraz inne związki. W testach na podłożu stałym oba mutanty wykazały zwiększoną w stosunku do szczepu dzikiego wrażliwość na streptomycynę, dihydrostreptomycynę i izoniazyd, jednak takich różnic nie zaobserwowano badając działanie antybiotyków w hodowlach płynnych.

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

Dalsze analizy dotyczące regulatora Rv0260c przeprowadzono na modelu *M. smegmatis*, w genomie którego obecny jest gen kodujący białko MsmeG_0432, homolog czynnika transkrypcyjnego Rv0260c. Zaplanowane doświadczenia miały na celu poznanie funkcji białka w metabolizmie związków azotowych, uwzględniając rolę globalnego regulatora metabolizmu azotu MsmeG_5784, bezpośrednio kontrolującego ekspresję genu *msmeG_0432*. Zastosowane dla mutantu $\Delta msmeG_0432$ *M. smegmatis* analizy fenotypowe systemem BIOLOG oraz profilowanie transkrypcyjne szczepów $\Delta msmeG_0432$ i $\Delta msmeG_5784$ hodowanych w warunkach głodu azotowego wykazały udział białka MsmeG_0432 w asymilacji azotanów i azotynów oraz detoksyfikacji komórki z tlenu azotu. W hodowlach w podłożu płynnym potwierdzono, że mutant $\Delta msmeG_0432$ nie jest zdolny do wzrostu, kiedy jedynym źródłem azotu w środowisku jest azotan lub azotyn sodu. Oceniając stężenie azotynów i jonów amonowych w hodowlach z azotanem sodu dowiedziono, że mutant jest zdolny do redukcji azotanów, natomiast zaburzeniu w komórce uległy szlaki konwersji azotynów do amoniaku.

Globalna analiza transkryptomu pozwoliła określić regulon białka MsmeG_0432, kontrolowany przez czynnik transkrypcyjny w odpowiedzi na zużycie środowiskowego azotu. Wykazano także, że białko MsmeG_0432 wiąże się do sekwencji promotorowych regulowanych genów w pobliżu miejsca wiązania białka MsmeG_5784 wskazując na występowanie mechanizmu współregulacji. Badając oddziaływania rekombinowanych białek MBP-MsmeG_0432 i His-MsmeG_5784 z sekwencjami promotorowymi wybranych genów,

stosując pojedyncze białka lub ich mieszaninę potwierdzono, że obecność globalnego regulatora jest wymagana do związania przez białko Msmeg_0432 niektórych sekwencji promotorowych. Analiza oddziaływania potencjalnych współregulatorów wykazała natomiast słabą interakcję między rekombinowanymi białkami.

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

Antiaia Magdalena

Streszczenie w języku angielskim

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

Tuberculosis, the infectious disease killing hundreds of thousands of people each year, has become a major worldwide problem because of the increasing drug resistance. Efficient adaptation of *M. tuberculosis* to environmental conditions, maintenance of vital functions along with multiple mycobacterial metabolic pathways are under the control of two component signal transduction systems (TCSs). A typical TCS consists of a histidine kinase anchored in cell membrane and a cytoplasmic regulatory protein. Environmental signals may cause kinase autophosphorylation followed by the transfer of a phosphate residue onto intracellular regulatory protein, which regulates the expression of specific genes in response to the stimulus. *M. tuberculosis* possesses at least eleven two component systems and five “orphan” regulatory proteins with unidentified kinases. In the present study two of such kind regulators were investigated: Rv0195 and Rv0260c (MsmeG_0432 in *M. smegmatis*). The main aim of the experiments was to determine the function of the investigated transcriptional factors in the physiology and pathogenesis of *M. tuberculosis*. The study was performed exploiting *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* as model organisms.

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

The growth kinetics and viability analysis of Δ r_v0195 *M. tuberculosis* mutant in the presence of oxygen and nitrogen radicals showed no difference in analyzed parameters when comparing the mutant to the wild type strain. On the other hand, the viability of Δ r_v0195 was significantly affected during the stationary phase of growth in liquid medium without stress inducers. Additionally, the strain displayed delayed colony formation on solid medium. The same experiments for Δ r_v0260c strain revealed, that the mutant is significantly less sensitive to oxygen radicals than the wild type strain.

The sensitivity of mutants to antitubercular agents was assayed using two independent methods. Experiments on solid medium containing tested antibiotics demonstrated increased sensitivity of both Δ r_v0195 and Δ r_v0260c *M. tuberculosis* mutants

to streptomycin, dihydrostreptomycin and isoniazid, however this effect was not observed when bacteria were cultured in liquid medium in the presence of drugs.

Further characteristics of Rv0260c regulatory protein was performed using *M. smegmatis* model, whose genome possess gene encoding Msmeg_0432 protein, homologues of Rv0260c regulator. The purpose of this part of work was to determine the function of transcriptional factor in nitrogen metabolism including the role of global nitrogen regulator Msmeg_5784, which directly controls the expression of *msmeg_0432* gene. BIOLOG Phenotype Microarray analysis and RNA sequencing of Δ *msmeg_0432* and Δ *msmeg_5784* *M. smegmatis* mutants cultured under nitrogen-depletion conditions revealed, that the Msmeg_0432 protein is involved in assimilation of nitrogen derived from nitrates and nitrites. It was confirmed in liquid cultures containing sodium nitrate or sodium nitrite as a sole nitrogen source. The Δ *msmeg_0432* mutant exhibited impaired growth in relation to the wild type strain. Determination of concentration of nitrites and ammonium ions in cultures with sodium nitrate showed, that the mutant is capable of reducing nitrates to nitrites, however cannot convert nitrites to ammonia.

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

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

Anitza Magdalena