

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 *pdtA* *M. smegmatis*. Z wykorzystaniem spektrometrii mas zaobserwowano różnice ilościowe w składzie białek rybosomalnych mutanta w stosunku do szczepu kontrolnego. Następnie wykonano test wydajności translacji, aby zweryfikować, czy zmiany w składzie rybosomu mutanta mogą potencjalnie prowadzić do zmiany szybkości translacji. Wykazano, że wydajność translacji określona poprzez pomiar aktywności β -galaktozydazy była obniżona w mutancie $\Delta pdtA$ *M. smegmatis*.

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

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że brak funkcjonalnego białka PdtA 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 PdtA powoduje zmniejszenie aktywności katalazy w komórkach prątków, co skutkuje zwiększeniem oporności na izoniazyd.

Kowalik
Ambaszek

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.

Korolowa
Ambrowska

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 $\Delta pdtA$ *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 β -galactosidase activity was reduced in the mutant $\Delta pdtA$ *M. smegmatis*.

Data obtained from the global analysis of transcriptomes for mutant cells of *M. smegmatis* $\Delta pdtA$ and *M. tuberculosis* $\Delta pdtA$ strains suggest that the lack of functional PdtA 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* $\Delta pdtA$ 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* $\Delta pdtA$ mutant strain was three times lower than in the cells of the control strain. This explains the cause of the increased resistance of the $\Delta pdtA$ *M. smegmatis* mutant strain to isoniazid.

The obtained results show that the lack of functional PdtA 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 PdtA protein causes a decrease in the activity of catalase in mycobacteria cells, which increases isoniazid resistance.