

Autor rozprawy doktorskiej: Mgr Katarzyna Struś

Tytuł rozprawy doktorskiej: Analiza funkcjonalna dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG6236/MSMEG6238 u *Mycobacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*)

Promotor pracy: Prof. dr hab. Jarosław Dziadek

Streszczenie Zarówno wewnątrzkomórkowe patogeny *M. tuberculosis* jak i szczepy saprofityczne takie jak *M. smegmatis* muszą posiadać zdolność adaptacji do zmian zachodzących w środowisku wzrostu, takich jak dostępność substancji odżywczych w tym źródeł węgla i azotu, obecność antybiotyków, metali ciężkich czy też elementów układu odpornościowego gospodarza. Do systemów adaptacyjnych, umożliwiających bakteriom dostosowanie się do niekorzystnych warunków zaliczamy m.in. dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs), które są zaangażowane w wiele procesów metabolicznych w tym w regulację szlaków katabolicznych, wykształcenie mechanizmów wirulencji czy transport substancji odżywczych.

Liczba TCSs występujących u bakterii jest zróżnicowana. Analiza genomów różnych gatunków bakterii wykazała, iż mikroorganizmy te mają średnio 52 TCSs. Większość TCSs zawiera dwa podstawowe komponenty: białko sensorowe tj. kinazę histydynową (HK) oraz jego docelowe białko regulatorowe (RR) czyli regulator odpowiedzi.

Systemem występującym w komórkach prątków *M. smegmatis*, nie mającym swojego odpowiednika u prątków gruźlicy, jest dwukomponentowy system transdukcji sygnału MnoSR, w skład którego wchodzi kinaza histydynowa MnoS (MSMEG_6238) oraz regulator odpowiedzi MnoR (MSMEG_6236). Geny kodujące system MnoSR tworzą wspólny operon (mnoSR) a ich produkty biorą udział w regulacji metabolizmu metylotroficznego u *M. smegmatis*. Wykonane w ramach pracy doktorskiej analizy miały pomóc w określeniu funkcji białek MnoS i MnoR, wchodzących w skład systemu MnoSR w metabolizmie prątków. W tym celu, przy zastosowaniu homologicznej rekombinacji, skonstruowano ukierunkowane, nieoznaczone mutanty *M. smegmatis* pozbawione genu msmeg_6236, msmeg_623 lub obu genów równocześnie. Uzyskane mutanty komplementowano także funkcjonalną kopią genów w celu uzyskania szczepów kontrolnych. Rekombinowane szczepy poddano następnie analizie wzrostu na podłożach minimalnych zawierających zdefiniowane źródła węgla i azotu. Analiza kinetyki wzrostu wykazała, że inaktywacja systemu MnoSR upośledza zdolność *M. smegmatis* do wykorzystania alkoholi takich jak 1,3-propandiol, metanol i etanol jako źródła węgla, nie wpływa natomiast na zdolność wykorzystania większości mono- i disacharydów z wyjątkiem fruktozy. Nie zaobserwowano natomiast upośledzenia wzrostu 165 rekombinowanych szczepów na

podłożu minimalnym z szeregiem organicznych i nieorganicznych źródeł azotu. Inaktywacja systemu MnoSR nie wpłynęła także na zmianę wrażliwości *M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe, tetracykliny, etambutol oraz rifampicynę. W celu poznania znaczenia systemu MnoSR w globalnej odpowiedzi prątków na limitowany dostęp węgla zastosowano metodę sekwencjonowania całkowitego RNA (RNASeq) szczepu kontrolnego oraz mutantu $\Delta(mtrA/glnR)$ rosnących na podłożu minimalnym z dodatkiem 2% glukozy, 0,1% glukozy (głodzenie) oraz 0,1% glukozy i 2% 1,3-propandiolu. Przeprowadzone analizy transkryptomocne pozwoliły na poznanie globalnej odpowiedzi prątków na głodzenie węglowe, a także na bezpośrednią bądź pośrednią, rolę MnoSR w metabolizmie *M. smegmatis* w warunkach dostępu (2%) bądź braku (0,1%) glukozy jako jedynego źródła węgla. Uzyskane dane transkryptomocne wskazały na znaczącą rolę MnoSR w metabolizmie pirogronianu pełniącego rolę substratu energetycznego a także stanowiącego źródło prekursorów dla licznych procesów biosyntetycznych takich jak synteza aminokwasów, puryn, pirymidyn czy glukozy. Ponadto zaobserwowano istotne zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm fruktozy, metanu oraz uczestniczące w szlaku pentozofosforanowym u szczepu pozbawionego funkcjonalnego systemu MnoSR.

Celem drugiej części badań było poznanie roli regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotu u mykobakterii. Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji konsensusowych dla podstawowego regulatora przemian azotowych u mykobakterii białka GlnR oraz białka MtrA, postawiono hipotezę, że białka te mogą wiązać te same sekwencje regulatorowe i współuczestniczyć w regulacji genów, których produkty warunkują transport lub utylizację źródeł azotu. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wykazano, że białka MtrA oraz GlnR wiążą się do sekwencji promotorowej genu *amtB* kodującego białko uczestniczące w transporcie amonu. Konstrukcja podwójnego mutantu, pozbawionego obu badanych białek regulatorowych oraz analiza zdolności do wzrostu szczepów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ na podłożu minimalnym zawierającym zdefiniowane źródła azotu wykazały, że brak regulatora MtrA upośledza zdolność prątków do wykorzystania organicznych źródeł azotu w postaci niektórych aminokwasów (histydyna, prolina, metionina, kwas glutaminowy). W celu poznania globalnej odpowiedzi badanych mutantów na deficyt dostępnego w podłożu azotu przeprowadzono badania transkryptomocne szczepu kontrolnego oraz mutantów $\Delta mtrA$ oraz $\Delta(mtrA/glnR)$ rosnących na podłożu minimalnym zawierającym siarczan amonu w stężeniu 1 mM. Analiza 166 danych transkryptomocnych pozwoliła zaobserwować zmianę ekspresji genów, których produkty są zaangażowane w przemiany azotowe w szczepach pozbawionych funkcjonalnego białka regulatorowego MtrA. Największe zmiany w ekspresji genów w mutancie $\Delta mtrA$ zaobserwowano dla enzymów zaangażowanych w metabolizm argininy, puryn, tyrozyny, jak również szlaków przemian alaniny, asparagianu i glutaminianu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na lepsze zrozumienie roli systemu MnoSR w regulacji metabolizmu węglowego u prątków oraz regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotowego.

Data

Podpis