

8. Streszczenie

Mycobacterium tuberculosis, będący czynnikiem etiologicznym gruźlicy, jest najgroźniejszym bakteryjnym patogenem człowieka. Wysoki poziom zachorowalności i śmiertelności spowodowany tą chorobą wciąż stanowi jedno z najpoważniejszych zagrożeń zdrowotnych współczesnego świata. Gruźlica wywołana szczepami lekowrażliwymi jest w pełni uleczalna. Jednak, w ostatnich latach, coraz częściej izoluje się szczepy prątków opornych na klasycznie stosowane leki, w tym szczepy wielolekooporne (MDR-TB) oraz o rozszerzonej oporności (XDR-TB), wobec których dzisiejsza medycyna często bywa bezradna. Ostatnie doniesienia epidemiologiczne mówią nawet o szczepach całkowicie opornych (TDR-TB). Alarmującym zjawiskiem są również współzakażenia prątkiem gruźlicy i wirusem HIV. Od wielu lat do terapii przeciwgruźliczej nie został wprowadzony żaden nowy lek, a lista obecnie stosowanych, biorąc pod uwagę konieczność stosowania w leczeniu gruźlicy terapii wielolekowej, jest dość ograniczona. Niezbędnym więc wydaje się poszukiwanie zarówno nowych tuberkulostatyków jak i nowych potencjalnych miejsc docelowych w komórkach prątków, które pozwolą na ukierunkowane poszukiwanie kolejnych leków przeciwgruźliczych. W tym kontekście, dobrym kandydatem wydaje się, niezbędna do wzrostu i znacznie różniąca się strukturalnie od swojego eukariotycznego odpowiednika, uczestnicząca w procesie replikacji DNA, mykobakteryjna prymaza DnaG.

Prymaza jest specyficzną polimerazą RNA zależną od jednoniciowego DNA, która odpowiada za syntezę *de novo* krótkich fragmentów RNA, pełniących rolę starterów w procesie replikacji. Polimeraza DNA nie posiada zdolności do inicjacji procesu syntezy nowego łańcucha i wymaga obecności wolnej grupy 3'-hydroksylowej dostarczanej przez startery RNA. Ze względu na pochodzenie wyróżniamy dwa typy prymaz. W komórkach bakterii występuje monomeryczne białko - prymaza DnaG - zbudowane z trzech głównych domen, oddziałujące w trakcie inicjacji replikacji z helikazą DnaB. Drugi typ to prymazy eukariotyczne i archeonów zbudowane z małej i dużej podjednostki. W komórkach eukariotycznych podjednostki te wchodzi w skład enzymatycznego kompleksu z polimerazą DNA α i podjednostką β . Na uwagę zasługuje również fakt, iż w genomie prątków zidentyfikowano dodatkowo białka blisko spokrewnione z prymazami archaea-eukariotycznymi (AEP).

Celem niniejszej pracy była biologiczna i biochemiczna charakterystyka mykobakteryjnego białka DnaG pod kątem wykorzystania go jako miejsca docelowego dla nowych tuberkulostatyków.

Niezbędność genu *dnaG* w komórkach prątków (*M. smegmatis*) potwierdzono przy wykorzystaniu modelu genetycznego opartego o homologiczną rekombinację. System ten pozwala na selekcję pojedynczych (SCO) oraz podwójnych (DCO) krzyżowych rekombinantów. Mutanty SCO posiadają chromosomalny gen *dnaG* oraz jego niefunkcjonalną kopię, zawierającą w miejscu wewnętrznej delecji gen oporności na gentamycynę, ułatwiający selekcję rekombinantów DCO. Ponieważ prymaza DnaG jest niezbędna dla przeżywania mykobakterii, uzyskanie mutantów DCO posiadających jedynie dezaktywowaną kopię genu *dnaG* jest niemożliwe.

Jednocześnie przy wykorzystaniu wyżej opisanej metodologii wykazano, że w przeciwieństwie do genu *dnaG*, możliwe jest usunięcie genów kodujących prymazy z rodziny AEP. Uzyskano szereg mutantów *M. smegmatis*, w których została wyłączona funkcja pojedynczych genów, a nawet wszystkich jednocześnie. To wskazuje na fakt, że prymazy AEP nie pełnią u mykobakterii funkcji niezbędnych w warunkach wzrostu *in vitro*.

W celu dodatkowej weryfikacji niezbędności genu *dnaG* zbadano możliwość zastąpienia mykobakteryjnej prymazy DnaG przez prymazę DnaG z *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* i *E. coli* oraz przez mykobakteryjne prymazy AEP w warunkach ich nadprodukcji. Analizowane geny sklonowano do plazmidu integracyjnego posiadającego chemicznie regulowany promotor acetamidowy lub tetracyklinowy (P_{ami}/P_{tet}) i wprowadzono w miejsce *attB* chromosomu komórek mutantu SCO $\Delta dnaG$. Jedynie nadprodukcja mykobakteryjnych prymaz DnaG pozwoliła na uzyskanie warunkowych mutantów DCO, w których funkcja zmutowanej kopii genu *dnaG* została zastąpiona przez funkcjonalny gen, wprowadzony na plazmidzie integracyjnym. Ponadto nieudana próba wymiany plazmidu zawierającego gen *dnaG* na „pusty” wektor integracyjny dodatkowo potwierdziła niezbędność DnaG dla przeżycia *M. smegmatis*.

W dalszym etapie badań, wykorzystując chromatografię powinowactwa, oczyszczono rekombinowane białka DnaG z *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Po immunizacji królika białkiem DnaG z *M. smegmatis*, uzyskano poliwalentną surowicę odpornościową. Przy wykorzystaniu przeciwciał anty-DnaG wykazano, że poziom białka

w warunkowym mutancie może być obniżony nawet o 83% w porównaniu do szczepu dzikiego bez wyraźnego efektu na wzrost tego szczepu.

W radioaktywnym teście *in vitro* potwierdzono aktywność obu oczyszczonych białek DnaG. Z wykorzystaniem techniki EMSA wykazano zdolność mykobakteryjnej prymazy DnaG do wiązania jednoniciowego DNA. Siła tego oddziaływania jest zależna zarówno od długości jak i sekwencji nukleotydowej matrycy DNA. W dalszych badaniach zidentyfikowano specyficzną sekwencję starterową, od której mykobakteryjna prymaza DnaG rozpoczyna syntezę startera RNA. Wykazano również, iż specyficzność ta zachowana jest jedynie w obecności jonów Mg^{2+} , zaś w przypadku użycia jonów Mn^{2+} zostaje ona zniesiona. Ponadto aktywność obu rekombinowanych białek hamowana jest przy niskich stężeniach doksorubicyny i suraminy, ostatnio zidentyfikowanych inhibitorów mykobakteryjnej prymazy DnaG.

W badaniach wrażliwości dzikich szczepów *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* oraz warunkowych mutantów na inhibitory prymazy DnaG wykazano, że jedynie doksorubicyna, w niskich stężeniach, hamuje wzrost badanych szczepów. Dodatkowo zaobserwowano, że warunkowy mutant, charakteryzujący się obniżonym poziomem białka DnaG, wykazywał zwiększoną wrażliwość na doksorubicynę w porównaniu do szczepu dzikiego.

Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że mykobakteryjna prymaza DnaG jest atrakcyjnym miejscem docelowym dla nowych leków przeciwgruźliczych. Oczyszczone białko pozwala na wstępną selekcję potencjalnych inhibitorów, których hamujące działanie może być weryfikowane z wykorzystaniem uzyskanych w niniejszej pracy rekombinowanych szczepów mutantów.

9. Abstract

Mycobacterium tuberculosis is one of the most dangerous human pathogens, causing tuberculosis. High level of morbidity and mortality caused by this disease is still one of the most serious health threats of the modern world. Tuberculosis caused by drug-sensitive *M. tuberculosis* strains is fully treatable. However, in recent years, the mycobacterial strains resistant to conventionally used drugs are isolated more frequently. The World Health Organization (WHO) estimates that 50 million individuals harbor multidrug-resistant strains (MDR-TB), which is resistant to at least rifampin and isoniazid. More disturbingly, strains of untreatable, extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB), which are additionally resistant to any fluoroquinolone and at least one of three injectable second-line drugs, have already been identified in 58 countries. These MDR-TB and XDR-TB strains, together with totally drug-resistant tuberculosis (TDR-TB) seem to represent the greatest health threat, and the medicine is often helpless. In this case the co-infection of tuberculosis and human immunodeficiency virus (HIV) is also alarming. For years, tuberculosis treatment was not enriched with a new drug, and the list of available tuberculostatics is seriously limited. This concern lead to the conclusions that new drugs and new anti-tuberculosis drug targets are required to control tuberculosis caused by drug resistant strains. The good drug-target candidate that is essential for mycobacterial growth and significantly different from its eukaryotic homologue, is DnaG primase which participate in the process of DNA replication.

Primase is a specific DNA-dependent RNA polymerase that catalyzes *de novo* synthesis of short RNA primers. These primers provide a free 3'-OH termini for DNA polymerase, which is unable to synthesize DNA *de novo*. Structurally, primases are divided into two classes. The first type is DnaG family enzyme, present in bacterial cells and bacteriophages. DnaG primase is a three domain protein that associates with DnaB helicase during replication fork formation. The second class consists of the primases of archaea and eukaryotic origin. These heterodimeric primases consist of small and large subunit and form a complex with DNA polymerase alpha and beta subunit. It is worth noting that proteins closely related with archaea-eukaryotic primases, named AEP, were identified in mycobacteria.

The microbiological and biochemical characterization of DnaG as a putative target for new antimycobacterial inhibitors was the main aim of this study.

We confirmed the indispensability of *dnaG* gene in mycobacterial cells (*M. smegmatis*) using homologous recombination protocol. This method allows for selection of single (SCO) and double (DCO) crossover recombinants. The SCO mutants carry both wild-type and mutated copy of *dnaG* gene. Because *dnaG* gene is essential for the viability of the cells, we were unable to identify DCO knock-out mutant strain carrying only mutated copy of the gene.

Using the same protocol we have shown, that unlike to *dnaG* gene, which appeared to be dispensable, it was possible to remove the intact copies of genes encoding AEP primases. We have engineered the number of DCO mutants of *M. smegmatis*, in which an individual gene or a few genes together were inactivated. It indicates that mycobacterial AEP primases are not essential for viability of *M. smegmatis*.

To further verify the essentiality of *dnaG* in mycobacteria, we examined the possibility of replacing chromosomal *dnaG* by its orthologous from *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* and *E. coli* as well as by AEP primases in conditions of their overproduction. The analyzed genes were cloned into a plasmid that placed it under the control of an acetamide- or tetracycline- inducible promoters (P_{ami}/P_{tet}) and introduced into *attB* locus of chromosomal DNA of SCO $\Delta dnaG/dnaG$ mutant. Only overproduction of *dnaG* of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* allowed us to obtain the conditional DCO mutants, in which a native *dnaG* was replaced with a mutated copy. Moreover, the *attB* integrated, intact copy of *dnaG* provided with pMV306Hyg^R vector in the conditional mutant was subjected for replacement with an “empty” pMV306Km^R plasmid confirming additionally the essentiality of DnaG for viability of *M. smegmatis*.

In the next step a pT7 Pol-based *E. coli* expression system was used to overproduce DnaG primases from *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. Recombinant proteins were purified using affinity chromatography and subsequently DnaG of *M. smegmatis* was utilized for vaccination of a rabbit to obtain polyclonal antibodies. The anti-DnaG polyclonal antibodies were used to monitor the level of protein in a conditional mutant and wild-type *M. smegmatis* strain. We observed that the decreasing of DnaG level did not affect significantly a growth of mutant.

The activity of DnaG protein was examined *in vitro* using a radioactive assay. Both primases, DnaG of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* displayed activity on the 24-nucleotide ssDNA and the activity decreased in case of shorter templates.

The protein:DNA interaction was examined by using EMSA technique. The analysis showed that mycobacterial DnaG primases bind to ssDNA template. The strength of this binding depends on both the length and sequence of the ssDNA template.

We found that in the presence of Mg^{2+} mycobacterial DnaG requires for its activity a ssDNA template carrying a 5'-TACTCTCATCGT**GGA/CA** consensus sequence. This sequence-specificity can be overcome by replacement of Mg^{2+} with Mn^{2+} cations. Moreover the DnaG activity was suppressed *in vitro* in the presence of doxorubicin and suramin, recently identified as a mycobacterial primase inhibitors.

Both inhibitors were used to check the susceptibility of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* cells. We found that doxorubicin but not suramin is active against fast and slow growing mycobacteria, and that the inhibition of growth depends on the available level of DnaG in the cells.

The obtained results allow to conclude that the mycobacterial DnaG primase is an attractive target for the new anti-tuberculosis drugs. The active protein enable pre-selection of potential inhibitors, whose inhibitory effect would be verified using recombinant strains.