



Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Mgr Filip Gąsior

Analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawy DNA – Msmeg_1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju *Mycobacterium*.

Functional analysis of potential DNA repair proteins – Msmeg_1891 and Rv3226c – in *Mycobacterium* genus.

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem: Promotora: dr hab. Anny Brzostek, prof. IBM PAN Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi Promotora pomocniczego: dr Przemysława Płocińskiego Uniwersytet Łódzki

Łódź, 2023

Z wielką radością i wdzięcznością chciałbym podziękować wszystkim Pracownikom Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, w szczególności Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium za wsparcie i zaangażowanie w proces tworzenia mojej pracy doktorskiej. To był wyjątkowo wymagający czas w moim życiu, a Wasze nastawienie i uprzejmość już od pierwszych dni gdy byłem jeszcze praktykantem pozostaną dla mnie nieocenione.

Dziękuję mojemu Promotorowi Pomocniczemu, dr Przemysławowi Płocińskiemu za ogrom przekazanej wiedzy i wsparcie merytoryczne przy wykonywanej pracy, a także za poświęcony czas w planowaniu i realizacji zadań badawczych.

Jestem szczególnie wdzięczny mojej Pani Promotor, dr hab. Annie Brzostek, prof. IBM PAN, bez której niniejsza praca doktorska nigdy by nie powstała. Przez wszystkie lata pracy z Panią Profesor mogłem poznać niezliczone techniki pracy przy laboratoryjnym stole, ale najcenniejsze lekcje otrzymałem poza nim, mogąc przebywać w towarzystwie tak życzliwej, cierpliwej i przede wszystkim wyrozumiałej Osoby jaką jest Pani Profesor.

Dziękuję mojej Żonie za nieustające wsparcie mentalne, wiarę i motywację szczególnie w najtrudniejszych momentach.

Dziękuję moim Rodzicom za wsparcie podczas wszystkich lat studiów, za okazany przykład jak stawać się dobrym człowiekiem.

N ARODOWE C ENTRUM N AUKI

Praca wykonana w ramach realizacji grantu Narodowego Centrum Nauki,

OPUS 17 nr. 2019/33/B/NZ1/02770, pt.: "Weryfikacja roli białek – przewidywanych czynników naprawczych, biorących udział w naprawach pęknięć DNA u mykobakterii".

Kierownik projektu: dr Przemysław Płociński

Dorobek naukowy

Publikacje

- Minias A., Żukowska L., Lechowicz E., Gąsior F., Knast A., Podlewska S., Zygała D., Dziadek J. Early drug development and evaluation of putative antitubercular compounds in the omics era. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11:618168.
 100 pkt. MEiN; IF = 5,640.
- Minias A., **Gąsior F**., Brzostek A., Jagielski T., Dziadek J. Cobalamin is present in cells of non-tuberculous mycobacteria, but not in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific Reports*. 2021; 11:12267.

140 pkt. MEiN; IF = 4,379.

- Brzostek A., Płociński P., Minias A., Ciszewska A., Gąsior F., Pawełczyk J., Dziadek B., Słomka M., Dziadek J. Dissecting the RecA-(In)dependent Response to Mitomycin C in *Mycobacterium tuberculosis* Using Transcriptional Profiling and Proteomics Analyses. *Cells*. 2021; 10(5):1168.
 140 pkt. MEiN; IF = 6,600.
- Brzostek A., Gąsior F., Lach J., Żukowska L., Lechowicz E., Korycka-Machała M., Strapagiel D., Dziadek J. ATP-Dependent Ligases and AEP Primases Affect the Profile and Frequency of Mutations in Mycobacteria under Oxidative Stress. *Genes*. 2021; 12(4):547.

100 pkt. MEiN; IF = 4,096.

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF; *z ang*. Impact Factor) publikacji: **20,715**. Łączna liczba punktów wg listy czasopism punktowanych MEiN: **480**.

Doniesienia konferencyjne

- Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. Udział białka Msmeg_1891 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA u prątków M. smegmatis. Makro- kierunki w mikro-biologii. 02. 12. 2019, Warszawa, Polska.
- Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. Determination of the Msmeg_1891 role in response to DNA damage in M.smegmatis. ESM 41st Annual Congress (Virtual), 28-29.06.2021, Tirana, Albania.
- Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. Functional analysis of a potential DNA repair protein Msmeg_1891 in Mycobacterium smegmatis. Polski Kongres Genetyki. 27-30.06.2022, Kraków, Polska.
- Gąsior F., Płociński P., Dziadek J., Brzostek A. Deciphering the role of SRAP proteins associated with DNA damage repair in Mycobacterium. Gordon Research Seminars, Tuberculosis Drug Discovery and Development. 22-23.07.2023, Castelldefels, Hiszpania.

Spis treści

1. Lista skrótów i skrótowców1	D
2. Wstęp 13	3
2.1. Ogólna charakterystyka rodzaju <i>Mycobacterium</i> 13	3
2.2. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA u <i>Mycobacterium</i> 1	5
2.2.1. Naprawa poprzez wycinanie zasady azotowej (BER)1	5
2.2.2. Naprawa uszkodzeń poprzez wycinanie nukleotydu (NER) 18	8
2.2.3. Naprawa poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ)	D
2.2.4. Naprawa poprzez homologiczną rekombinację (HR) 22	2
2.2.5. Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)2	5
2.2.6. System naprawy SOS 2	5
2.2.7. Rodzina peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP)	8
3. Cel pracy 3	1
3. Materiały 3	2
3.1. Szczepy bakteryjne 32	2
3.2. Syntetyczne oligonukleotydy 34	1
3.3. Wektory plazmidowe 3	8
3.4. Enzymy	2
3.5. Mieszaniny reakcyjne 44	4
3.6. Bufory i roztwory 4	5
3.6.1. Bufory i roztwory wykorzystane w procesie elektroforezy	5
3.6.2. Bufory obciążające 4	5
3.6.3. Bufory do oczyszczania białek w fuzji ze znacznikiem HIS	7
3.6.4. Bufory i roztwory wykorzystane w metodzie western blot 4	8
3.6.5. Bufory wykorzystane w przygotowaniu komórek kompetentnych E. coli 4	9
3.6.6. Bufory wykorzystane w metodzie Southern blot	D
3.6.7. Bufory wykorzystane do otrzymywania kompleksów białkowych na złożu anty - FLAG5	1
3.6.8. Pozostałe bufory i roztwory52	2
3.7. Żele do rozdziału elektroforetycznego5	3
3.8. Standardy wielkości	4
3.9. Podłoża mikrobiologiczne 5	5

3.:	10. Substancje dodawane do podłóż mikrobiologicznych	56
3.:	11. Odczynniki	57
3.:	12. Zestawy komercyjne	59
3.:	13. Pozostałe odczynniki i materiały	60
3.:	14. Aparatura	60
4. M	etody	62
4.:	1. Hodowle bakteryjne	62
4.2	2. Techniki wykorzystane do pracy z DNA	62
	4.2.1. Izolacja plazmidowego DNA	62
,	4.2.2. Izolacja chromosomalnego DNA	63
,	4.2.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	63
,	4.2.4. Trawienie enzymami restrykcyjnymi	63
,	4.2.5. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	64
,	4.2.6. Elucja DNA z żelu agarozowego	64
,	4.2.7. Precypitacja DNA	64
	4.2.8. Łączenie fragmentów DNA	64
,	4.2.9. Sekwencjonowanie DNA	65
	4.2.10. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych	65
,	4.2.11. Transformacja komórek <i>E. coli</i>	65
,	4.2.12. Transformacja komórek Mycobacterium	65
	4.2.13. Konstrukcja plazmidów do rekombinacji homologicznej i selekcja mutantó delecyjnych <i>Mycobacterium</i>	w 66
	4.2.14. Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów DCO	u
	Mycobacterium	68
	4.2.15. Konstrukcja plazmidu z obniżonym poziomem ekspresji genu <i>msmeg_189</i> . u <i>M. smegmatis</i>	1 69
	4.2.16. Konstrukcja wektora do poszukiwania białek partnerskich dla białka Msmeg_1891 i oczyszczanie kompleksów białkowych	70
	4.2.17. Hybrydyzacja techniką Southern blot	71
4.3	3. Techniki wykorzystane do pracy z RNA	71
	4.3.1. Izolacja RNA z komórek <i>Mycobacterium</i>	71
	4.3.2. Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania	72

4.3.3. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (qRT -
PCR)
4.4. Techniki wykorzystane do pracy z białkami74
4.4.1. Konstrukcja wektorów do nadprodukcji białka Msmeg_1891
4.4.2. Elektroforeza pionowa w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS – PAGE)
4.4.3. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka Msmeg_1891 w heterologicznych układach <i>E. coli</i> BL21 i <i>E. coli</i> Rosetta
4.4.4. Test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym EMSA (<i>z ang.</i> Electrophoretic Mobility Shift Assay) - badanie oddziaływania białko - DNA/RNA
4.4.5. Termoforeza mikroskalarna - badanie siły oddziaływania białka – substraty DNA/RNA
4.4.6. Rozdział elektroforetyczny w żelach denaturujących z mocznikiem - test na aktywność białka Msmeg_1891 metodą UREA - PAGE
4.4.7. Otrzymywanie lizatów białkowych z <i>Mycobacterium</i>
4.4.8. Immunodetekcja z zastosowaniem techniki western blot
4.5. Techniki wykorzystane w analizach fenotypowych
4.5.1. Ocena wrażliwości szczepów mykobakterii po ekspozycji hodowli na działanie czynników genotoksycznych z zastosowaniem testu punktowego wysiewu hodowli bakteryjnej potraktowanej czynnikiem uszkadzającym po wykonaniu szeregu rozcieńczeń hodowli
4.5.2. Ocena wrażliwości szczepów mykobakterii po ekspozycji hodowli na działanie
czynników genotoksycznych metodą określania liczby żywych komórek (CFU) 83
5. Wyniki
5.1. Konstrukcja mutantów delecyjnych <i>M. smegmatis i M. tuberculosis</i> oraz mutanta z obniżonym poziomem ekspresji genu <i>msmeg_1891.</i>
5.2. Fenotypowa analiza przeżywalności szczepów mutantów mykobakterii po ekspozycji na wybrane czynniki genotoksyczne
5.3. Oczyszczanie rekombinowanego białka Msmeg_1891
5.4. Określenie specyficzności substratowej białka Msmeg_1891
5.4.1. Test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (EMSA; <i>electrophoretic mobility shift assay</i>)
5.4.2. Test oceny aktywności białka Msmeg_1891 w warunkach denaturujących (UREA – PAGE)100

5.5. Analiza siły oddziaływania białka Msmeg_1891 z substratami zawierającymi deoksy(uracyl) z wykorzystaniem metody termoforezy mikroskalarnej	108
5.6. Identyfikacja białek partnerskich dla białka Msmeg_1891	110
5.7. Ocena poziomu ekspresji <i>msmeg_1891</i> i ilości białka Msmeg_1891 po ekspo	zycji
hodowli na działanie metanosulfonianu metylu (MMS)	112
5.8. Analiza transkryptomiczna szczepu <i>M. tuberculosis</i> Δrv3226c	114
6. Dyskusja	118
7. Wnioski i stwierdzenia końcowe	129
8. Streszczenie	130
9. Abstract	132
10. Literatura	134

1. Lista skrótów i skrótowców

Ar	miejsce apurynowe/apirymidynowe (z ang. apurinic/apyrimidinic side)				
APE	endonukleaza apurynowa/apirymidynowa (<i>z ang.</i> apurinic/apyrimidinic endonuclease)				
Ap ^R	oporność na ampicylinę (z ang. ampicillin resistance)				
APS	nadsiarczan amonu (<i>z ang.</i> ammonium persulfate)				
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (z ang. adenosine triphosphate)				
BER	naprawa przez wycinanie zasad azotowych (<i>z ang.</i> base excision repair)				
CFU	jednostki koloniotwórcze (z ang. colony forming units)				
COVID-19	z ang. coronavirus disease 2019				
CRISPR	zgrupowane, regularnie rozproszone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromowe (<i>z ang.</i> Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)				
dCas9	inaktywowane białko Cas9 (z ang. deactivated Cas9 protein)				
dCas9 DMSO	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang.</i> deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang.</i> dimethyl sulfoxide)				
dCas9 DMSO DNA	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang.</i> deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang.</i> dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang.</i> deoxyribonucleic acid)				
dCas9 DMSO DNA dNTP	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang.</i> deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang.</i> dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang.</i> deoxyribonucleic acid) mieszanina trójfosforanów deoksyadenozyny, deoksycytydyny, deoksyguanozyny, deoksytymidyny				
dCas9 DMSO DNA dNTP dRpase	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang.</i> deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang.</i> dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang.</i> deoxyribonucleic acid) mieszanina trójfosforanów deoksyadenozyny, deoksycytydyny, deoksyguanozyny, deoksytymidyny fosfodiesteraza deoksyrybozy (<i>z ang.</i> deoxyribosephosphodiesterase)				
dCas9 DMSO DNA dNTP dRpase DSB	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang</i> . deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang</i> . dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang</i> . deoxyribonucleic acid) mieszanina trójfosforanów deoksyadenozyny, deoksycytydyny, deoksyguanozyny, deoksytymidyny fosfodiesteraza deoksyrybozy (<i>z ang</i> . deoxyribosephosphodiesterase) dwuniciowe pęknięcia DNA (<i>z ang</i> . double strand breaks)				
dCas9 DMSO DNA dNTP dRpase DSB dUTP	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang</i> . deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang</i> . dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang</i> . deoxyribonucleic acid) mieszanina trójfosforanów deoksyadenozyny, deoksycytydyny, deoksyguanozyny, deoksytymidyny fosfodiesteraza deoksyrybozy (<i>z ang</i> . deoxyribosephosphodiesterase) dwuniciowe pęknięcia DNA (<i>z ang</i> . double strand breaks) urydyno-5'-trójfosforan (<i>z ang</i> . uridine-5'-triphosphate)				
dCas9 DMSO DNA dNTP dRpase DSB dUTP EDTA	inaktywowane białko Cas9 (<i>z ang.</i> deactivated Cas9 protein) dimetylosulfotlenek (<i>z ang.</i> dimethyl sulfoxide) kwas deoksyrybonukleinowy (<i>z ang.</i> deoxyribonucleic acid) mieszanina trójfosforanów deoksyadenozyny, deoksycytydyny, deoksyguanozyny, deoksytymidyny fosfodiesteraza deoksyrybozy (<i>z ang.</i> deoxyribosephosphodiesterase) dwuniciowe pęknięcia DNA (<i>z ang.</i> double strand breaks) urydyno-5'-trójfosforan (<i>z ang.</i> uridine-5'-triphosphate) sól sodowa kwasu etyleno-diamino-tetraoctowego				

HR	homologiczna rekombinacja (z ang. homologous recombination)
IPTG	izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd
Km ^R	oporność na kanamycynę (z ang. kanamycin resistance)
Km ^R	oporność na kanamycynę (z ang. kanamycin resistance)
LigD	ligaza D
MCS	sekwencja polilinkerowa (z ang. Multiple Cloning Site)
MDR	szczepy wielolekooporne (z ang. multidrug - resistance)
ММС	mitomycyna C (<i>z ang.</i> mitomycin C)
MMR	naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (z ang. mismatch repair)
MMS	metanosulfonianu metylu (z ang. methyl methanesulfonate)
NB	bulion odżywczy (<i>z ang.</i> Nutrient Broth)
NER	naprawa uszkodzeń DNA przez wycinanie nukleotydów (<i>z ang.</i> nucleotide excision repair)
NHEJ	naprawa uszkodzeń DNA poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA (<i>z ang.</i> non-homologous DNA end joining)
OADC	katalaza z dekstrozy albumin oleinowych (<i>z ang.</i> Oleic Albumin Dextrose Catalase)
OD ₆₀₀	gęstość optyczna zawiesiny komórek bakteryjnych badana z wykorzystaniem fali o długości λ=600 nm (<i>z ang.</i> optical density)
ORF	otwarte ramki odczytu (<i>z ang</i> . open reading frames)
PAM	z ang. protospacer adjacent motif
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. polymerase chain reaction)
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu (<i>z ang.</i> phenylmethylsulfonyl fluoride)

pz	para zasad (<i>z ang.</i> base pair)
RER	naprawa poprzez wycinanie rybonukleotydu (<i>z ang</i> . ribonucleotide excision repair)
RFT	reaktywne formy tlenu
RNA	kwas rybonukleinowy (<i>z ang.</i> ribonucleic acid)
SDS	siarczan dodecylu sodu
SOS	naprawa uszkodzeń DNA, nazywana odpowiedzią SOS (<i>z ang.</i> save our souls)
SRAP	rodzina peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (<i>z ang.</i> SOS response associated peptidases)
ssDNA	forma jednoniciowa DNA (z ang. single stranded DNA)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TET	enzymy modyfikacji 5-metylocytozyny (<i>z ang.</i> ten-eleven translocation enzymes)
UDG	glikozylaza uracyl-DNA (z ang. uracil-DNA glycosylase)
UREA-PAGE	rozdział elektroforetyczny w żelach denaturujących z mocznikiem (urea poliacrylamid gel electrophoresis)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (z ang. ultraviolet radiation)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. World Health Organisation)
XDR	szczepy o rozszerzonej oporności na leki (<i>z ang</i> . extensively drug - restistant)

2. Wstęp

2.1. Ogólna charakterystyka rodzaju Mycobacterium

Rodzina Mycobacteriaceae stanowi wyróżniającą się pod względem cech genotypowych i fenotypowych jednostkę taksonomiczną bakterii należących do typu promieniowców (Actinobacteria). Obejmuje on grupę tlenowych, Gram - dodatnich lub słabo Gram - dodatnich organizmów o pałeczkowatym, lekko zakrzywionym kształcie (Fedrizzi i in., 2017; Gupta i in., 2018; Gao i Gupta, 2012). Bakterie te nie wytwarzają przetrwalników, posiadają natomiast – podobnie jak Rhodococcus, Nocardia, Gordonia czy Tsukamurella – unikalną budowę ściany komórkowej, która jest bogata w długołańcuchowe kwasy tłuszczowe - kwasy mykolowe. Charakterystyczna budowa ściany komórkowej w dużej mierze przyczynia się do kwasooporności prątków (Franco - Paredes i in., 2018; Forbes i in., 2018). Obecnie, do rodziny Mycobacteriaceae zalicza się ponad 190 zidentyfikowanych gatunków, izolowanych m.in. z gleby, powietrza, od dzikich zwierząt, roślin, z naturalnych źródeł wody pitnej czy produktów spożywczych (Sharma i Upadhyay, 2020; Gupta i in., 2018; Falkinham, 2015; Honda i in., 2018). W oparciu o dane fenotypowe, prątki można podzielić na dwie grupy ze względu na szybkość ich wzrostu – szybko i wolno rosnące, a w dalszej kolejności na określone kompleksy lub grupy (np. w zależności od ilości par G:C, czy liczbę otwartych ramek odczytu (ORF) w ich genomach) (Fedrizzi i in., 2017; Meehan i in., 2021). Szczególnie niebezpiecznymi dla człowieka są patogenne prątki (Rycina 2.1.), wywołujące wiele ciężkich chorób, takich jak m.in. gruźlica (M. tuberculosis), trąd (M. leprae), głębokie skórne owrzodzenia (M. ulcerans) i wiele innych (Franco- Paredes i in., 2018; Gao i Gupta, 2012). Jednym z najbardziej niebezpiecznych gatunków z rodzaju Mycobacterium jest czynnik etiologiczny gruźlicy, M. tuberculosis. Według raportu Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2021 roku w wyniku zakażenia prątkami gruźlicy zmarło ok. 1,6 mln ludzi. Pomimo, że zachorowalność na gruźlicę rokrocznie spada o ok. 2%, to choroba ta jest nadal 13 najczęstszą przyczyną śmierci na świecie, a drugą (po COVID-19) o podłożu zakaźnym. Dodatkowym powodem powolnego spadku zachorowań na gruźlicę jest powstawanie szczepów M. tuberculosis opornych na najczęściej stosowane leki, w tym rifampicynę

i izoniazyd – MDR (*z ang.* Multidrug - Resistant) oraz szczepów o szerokiej oporności - XDR (*z ang.* Extensively Drug - Restistant), dodatkowo tolerujących terapię opartą o użycie m.in. fluorochinolonów (Espinosa – Pereiro i in., 2022).

Ze względu na zbliżone cechy fenotypowe, morfologiczne i biochemiczne, modelami badawczymi niniejszej pracy są szybko rosnący prątek *Mycobacterium smegmatis* (przemianowany niedawno na *Mycolicibacterium smegmatis*, Gupta i in., 2018, Yamada i in., 2020) obok patogennego, wolno rosnącego szczepu *M. tuberculosis*.



Rycina 2.1. Klasyfikacja patogennych dla człowieka prątków z rodzaju *Mycobacterium* (na podstawie Franco – Paredes i in., 2018).

Z uwagi na zasiedlane nisze, prątki narażone są na działanie szeregu czynników powodujących uszkodzenia ich materiału genetycznego. Z tego względu – w celu zapewnienia integralności genomów – wykształciły one różne mechanizmy napraw uszkodzeń DNA, omówione w tym rozdziale.

2.2. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA u Mycobacterium

2.2.1. Naprawa poprzez wycinanie zasady azotowej (BER) (Rycina 2.2.)

System naprawy uszkodzeń DNA poprzez wycinanie zasad azotowych (z ang. Base Excision Repair, BER) odpowiedzialny jest za naprawę niewielkich uszkodzeń DNA, które najczęściej nie są związane ze zniekształceniem jego struktury. Zmienione pod względem chemicznym nukleotydy, będące konsekwencją: alkilacji (np. 7-metyloguanina, 3-metyloadenina), utleniania (np. 8-oksoguanina, 5-hydroksycytozyna, 4,6-diamino-5formamidopirymidyna) lub deaminacji (np. cytozyna do uracylu), naprawiane są z wykorzystaniem tego systemu niezależnie od fazy wzrostu i postępu procesu replikacji DNA (Singh, 2017; Van der Veen i Tang, 2015). Jednym z najczęściej występujących uszkodzeń DNA jest powstanie 8-oksoguaniny, spowodowane przez niski potencjał redoks tej zasady azotowej (Singh, 2017). Ze względu na wysoką częstość występowania w genomie prątków par G:C (ok. 65,6%), genom tych drobnoustrojów jest szczególnie narażony na powstawanie takich zmian (Cole i in., 1998; Neeley i Essigmann, 2006). Stabilność i wysoki potencjał mutagenny 8-oksoguaniny prowadzi do utworzenia pary G:A, prowadząc do transwersji G:C – T:A (Shibutani i in., 1991; Zharkov i Endutkin, 2021). Głównymi białkami zaangażowanymi w naprawy uszkodzeń oksydacyjnych u mykobakterii są glikozylazy DNA Fpg1/Fpg2, Nei1/Nei2, MutY oraz Nth (Singh, 2017; Mullins i in., 2019). Na pierwszym etapie naprawy, glikozylaza DNA Fpg1 wycina 8-oksoguaninę w sytuacji gdy jest ona sparowana z cytozyną, tyminą lub guaniną, natomiast błędnie sparowana z nią adenina usuwana jest przez MutY (Guo i in., 2010; Singh, 2017). W komórkach M. tuberculosis zidentyfikowano również białka Nei1/Nei2 oraz Nth, w mniejszym stopniu przyczyniające się do usuwania 8-oksoguaniny (Moolla i in., 2014; Singh, 2017), a także białka z rodziny MutT (MutT1, MutT2, MutT3 oraz MutT4), hydrolizujące trójfosforany 8-oksoguaniny do ich monomerycznych form (Bessman i in., 1996). Kolejnym z często występujących uszkodzeń DNA naprawianych z wykorzystaniem szlaku z wycinaniem zasady azotowej jest występowanie w sekwencji DNA uracylu, będącego konsekwencją deaminacji cytozyny (Singh, 2017). W komórkach prątków, na drodze syntezy pirymidyn nieustannie powstaje urydyno-5'-trójfosforan (dUTP). Aby zapobiec jego włączaniu do sekwencji DNA, niezbędna jest obecność enzymów

regulujących jego ilość – nukleotydohydrolaz dUTP (Vértessy i Tóth, 2009). Szacuje się, że mimo ich obecności, dUTP może być wprowadzany do sekwencji DNA z częstotliwością ~10000/1 podział komórki (Alsøe i in., 2017). Na tym etapie, uracyl usuwany jest przez białka należące do glikozylaz DNA uracylu – UDG. Należące do rodziny I UDG - białko Ung - jest wysoce specyficzne w usuwaniu uracylu z zarówno jednoniciowego jak i dwuniciowego DNA, natomiast UdgB, należące do rodziny V UDG rozpoznaje sekwencje dwuniciowe (Naz i in., 2021). Ze względu na częstość występowania par G:C w genomie *M. tuberculosis*, drobnoustrój ten jest szczególnie narażony na deaminację cytozyny i powstanie uracylu w sekwencji DNA. Dodatkowo, uracyl może być wbudowany w sekwencję DNA podczas replikacji poprzez działanie polimerazy DNA (Kurthkoti i Varshney, 2011; Naz i in., 2021). W komórkach E. coli występują glikozylazy, które rozpoznają szeroki zakres uszkodzonych poprzez alkilację zasad azotowych. Produkty ekspresji genów ada oraz alkA u tych drobnoustrojów kontrolują odpowiedź adaptacyjną, podczas gdy u M. tuberculosis delecja tych genów nie wpływa znacząco na przeżywalność i wirulencję po ekspozycji na działanie czynników alkilujących (Singh, 2017). Inna glikozylaza DNA – Mpg, w komórkach prątków rozpoznaje uszkodzone na drodze metylacji puryny (Biswas i in., 2002; Singh, 2017). W komórkach prątków obecna jest także metylotransferaza O6-metyloguaniny (Ogt), przywracająca ją bezpośrednio do guaniny, na zasadzie przeniesienia grupy O6-alkilowej na konserwatywną cysteinę występującą w C-końcowej domenie białka Ogt (Ferraris i in., 2018).

W zależności od rodzaju uszkodzenia, zmieniona zasada azotowa rozpoznawana jest przez specyficzną glikozylazę DNA, poprzez działanie której dochodzi do hydrolizy wiązania N-glikozydowego pomiędzy zasadą azotową a resztą cukrową, przez co powstaje miejsce apurynowe/apirymidynowe. Miejsce to jest następnie przetwarzane przez egzonukleazę III (ExoIII/XthA) lub endonukleazę IV (EndoIV). Prowadzi to do lokalnego przerwania ciągłości jednej z nici DNA, pozbawionej pojedynczego nukleotydu i odsłonięcia wolnych końców nici DNA, zawierających 3'-OH a także 5'-P, stanowiących substraty dla polimerazy I DNA, wbudowującej brakujące deoksyrybonukleotydy. Na ostatnim etapie, ligaza DNA odtwarza wiązanie fosfodiestrowe i przywraca ciągłość nici DNA poddawanej naprawie. (Singh, 2017; Khanam i in., 2020).





Rycina 2.2. Schemat naprawy DNA przez wycinanie zasady azotowej (BER)
u *Mycobacterium*. A - Rozpoznanie uszkodzonej zasady azotowej przez specyficzną
glikozylazę - hydroliza wiązania N- glikozydowego. B – wycięcie miejsca AP przez
XthA/EndoIV. C – Wbudowanie brakującego nukleotydu przez polimerazę I DNA.
D – Odtworzenie wiązań fosfodiestrowych poprzez działanie ligazy DNA (na
podstawie Singh, 2017).

2.2.2. Naprawa uszkodzeń poprzez wycinanie nukleotydu (NER) (Rycina 2.3.)

Charakteryzujący się niską swoistością, wysoce konserwatywny proces naprawy poprzez wycinanie nukleotydów (z ang. Nucleotide Excision Repair, NER) jest przystosowany do rozpoznawania uszkodzeń powodujących zmianę struktury przestrzennej helisy DNA, np. powstających przez ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe dimerów cyklobutanopirymidyny (Selby i in., 2020). Najlepiej przebadanym i znanym przykładem systemu NER jest naprawa uszkodzeń DNA przy udziale układu białek naprawczych UvrABC. Na pierwszym etapie naprawy, kompleks białek UvrA i UvrB przy obecności ATP skanuje helisę DNA w poszukiwaniu zmian struktury przestrzennej. Alternatywnie, uszkodzenie może być rozpoznane wcześniej przez polimerazę RNA (RNAP), usuwaną w takim przypadku poprzez działanie czynnika sprzężenia naprawy z transkrypcją (TRCF, Mfd), dzięki czemu możliwa jest rekrutacja kompleksu UvrAB (Kisker i in., 2017). Następnie, białko UvrA oddysocjowuje, a pozostające na nici DNA białko UvrB rekrutuje w miejsce uszkodzenia białko UvrC, zawierające dwie domeny nukleazowe, konsekwencją czego jest przecięcie wiązania fosfodiestrowego 8 nukleotydów powyżej uszkodzenia (od końca 5') a także 4-5 nukleotydów poniżej uszkodzenia (od końca 3') (Kisker i in., 2017). Niedawno wykazano, że białko UvrC Mycobacterium tuberculosis, posiada zdolność do przecinania wiązań fosfodiestrowych na zasadzie podobnej do eukariotycznych odpowiedników (np. ludzkich) – 9 nukleotydów w kierunku 5' od uszkodzenia oraz 15 nukleotydów od końca 3' (Thakur i in., 2020; Selby i in., 2020). W wyniku działania UvrD (helikazy II), odcinek pomiędzy przeciętymi wiązaniami fosfodiestrowymi (zawierający uszkodzony nukleotyd) jest usuwany a polimeraza I DNA ma możliwość wypełnienia powstającej luki. Następnie, dzięki aktywności ligazy DNA następuje odtworzenie wiązań fosfodiestrowych i ciągłości nici DNA (Mittal i in., 2020; Hu i in., 2017; Kisker i in., 2017).



Rycina 2.3. Schemat naprawy DNA przez wycinanie nukleotydu (NER)
u *Mycobacterium*. A - Rozpoznanie uszkodzonego nukleotydu przez kompleks
UvrAB. B - Oddysocjowanie UvrA, przecięcie wiązań fosfodiestrowych przez UvrC.
C – Usunięcie oligomeru z uszkodzonym nukleotydem przez działanie UvrD;
uzupełnienie brakujących nukleotydów przez polimerazę I DNA. D – Odtworzenie
wiązań fosfodiestrowych przez ligazę DNA (na podstawie Singh, 2017).

2.2.3. Naprawa poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA (NHEJ) (Rycina 2.4.)

Pierwsze doniesienia o możliwości istnienia bakteryjnego systemu naprawy z łączeniem niehomologicznych końców DNA (z ang. Non – homologous end – joining; NHEJ), pochodziły z badań in silico. Zidentyfikowano wówczas białka w komórkach bakteryjnych, homologiczne do eukariotycznych białek Ku70/80 oraz zależnej od ATP ligazy DNA, zaangażowanych w naprawy NHEJ u tych organizmów (Aravind i Koonin, 2001; Doherty i in., 2001). W innych badaniach udowodniono in vitro, że aktywność mykobakteryjnego (*M. tuberculosis*) białka LigD jest promowana przez obecność białka Ku pochodzącego z tego samego organizmu. Dodatkowo wykazano obniżoną przeżywalność szczepów Bacillus subtilis z delecjami w obrębie genów LigD i Ku po ekspozycji hodowli na działanie promieniowania jonizującego (Weller i in., 2002). W kolejnych badaniach wykorzystano liniowe plazmidy z tępymi końcami 5', które transformowano do komórek E. coli, M. tuberculosis i M. smegmatis. W przypadku E. coli kolista forma plazmidów nie była odtwarzana, natomiast u prątków plazmidy ulegały recyrkularyzacji. Wykorzystując szczepy z delecją w obrębie genów kodujących białka Ku i LigD, wykazano, że recyrkularyzacja plazmidów była 500- krotnie mniej wydajna w porównaniu do szczepów dzikich (Aniukwu i in., 2008; Glickman, 2014).

Na pierwszym etapie naprawy, podwójne pęknięcie nici DNA rozpoznawane jest przez białko Ku, które wiąże się do jego wolnych końców. Następnie – tak jak w przypadku *M. tuberculosis* - rekrutowana jest zależna od ATP, wielofunkcyjna ligaza D posiadająca w swojej budowie domenę fosfodiesterazową (PE), polimerazową (Pol), a także ligazową (Lig). U wielu innych promieniowców, np. z rodzaju *Streptomyces*, zamiast wielofunkcyjnej ligazy D wszystkie trzy jednostki występują oddzielnie (Glickman, 2014; Bertrand i in., 2019). Pierwsza z nich rozpoznaje grupy fosforanowe, znajdujące się przy końcu 5' biorąc tym samym udział w tworzeniu tzw. synapsy. Dzięki aktywności 3'-5' fosfodiesterazowej, na końcach 3' uszkodzenia odsłaniane są grupy hydroksylowe OH⁻, dzięki czemu możliwe jest działanie polimerazy, uzupełniającej brakujące nukleotydy. W badaniach nad aktywnością tej domeny wykazano, że preferencyjnie wprowadza ona rybonukleotydu (*z ang.* Ribonucleotide excision repair; RER), lub podczas najbliższej rundy replikacji.

Ponadto NHEJ prowadzić może do zmian genetycznych w obrębie chromosomu, przez podatność na błędy takie jak np. utratę lub dodanie kilku nukleotydów w miejscu pęknięcia (Pitcher i in., 2007; Bartlett i in., 2013). Naprawa z łączeniem niehomologicznych końców DNA terminowana jest przez działanie domeny Lig, która odtwarza wiązania fosfodiestrowe, przywracając ciągłość nici (Glickman, 2014; Rodgers i McVey, 2016; Bertrand i in., 2019; Sowa i in., 2022).





Rycina 2.4. Schemat naprawy DNA przez łączenie niehomologicznych końców DNA u *Mycobacterium*. **A** – Rozpoznanie podwójnego pęknięcia DNA przez białka Ku. **B** – Rekrutacja ligazy D. **C** – Utworzenie synapsy, przetwarzanie końców 3', wbudowanie brakujących nukleotydów. **D** – Odtworzenie wiązań fosfodiestrowych (na podstawie Bertrand i in., 2019).

2.2.4. Naprawa poprzez homologiczną rekombinację (HR) (Rycina 2.5.)

System naprawy uszkodzeń DNA przez rekombinację homologiczną zarówno dla komórek eukariotycznych jak i prokariotycznych, jest procesem niezbędnym do przeżycia (Wang i in., 2022; Gupta i in., 2017). Indukowane w wyniku działania czynników genotoksycznych (np. reaktywnych produktów ubocznych metabolizmu komórkowego, promieniowania jonizującego itd.) podwójne pęknięcia nici DNA, naprawiane są u większości bakterii przez rekombinację homologiczną, wiernie odtwarzającą uszkodzony materiał genetyczny (Gupta i in., 2011). Na przykładzie modelowego szczepu E. coli, pierwszym etapem naprawy DNA przez rekombinację homologiczną jest rozpoznanie pęknięcia nici przez kompleks białkowy helikazy - nukleazy RecBCD, która wiążąc się do uszkodzenia, prowadzi do resekcji miejsca DSB (z ang. Double Strand Break) i powstania jednoniciowego końca 3', do którego przyłącza się białko SSB (z ang. Single Strand Binding) (Wigley, 2013; Gupta i in., 2017). Na kolejnym etapie białko SSB oddysocjowuje z jednoniciowego DNA, a w miejsce to przyłącza się białko RecA tworząc włókno nukleoproteinowe, którego zadaniem jest poszukiwanie homologii i inwazji nici do chromatydy siostrzanej (Pagès, 2016; Laureti i in., 2015). Następnie, koniec 3'-OH inwazyjnej nici zapoczątkowuje syntezę DNA, powstają połączenia nazywane strukturą Holidaya, w których zachodzi uzupełnianie powstałych luk w ciągłości nici oraz odtworzenie wiązań fosfodiestrowych (Gupta i in., 2017; Mallikarjun i in., 2022; Wigley, 2013). Udowodniono, że szczepy E. coli z delecją w obrębie genów kodujących białka tworzące kompleks RecBCD, nie są zdolne do naprawy podwójnych pęknięć nici DNA (White, 2018; Gupta i in., 2017).

Pomimo, że w komórkach prątków występuje kompleks RecBCD, to w przeciwieństwie do *E. coli*, jego obecność nie jest konieczna do naprawy DSB (Stephanou i in., 2007; Aniukwu i in., 2008). Wykazano natomiast, że RecBCD jest niezbędny

w naprawie przez łączenie pojedynczych nici – SSA (*z ang.* Single Strand Annealing) (Verma i Greenberg, 2016; Gupta i in., 2013). W przypadku *E. coli*, aktywność helikazowa kompleksu RecBCD ograniczana jest poprzez obecność sekwencji Chi (5'-GCTGGTGG-3'), które u *M. tuberculosis* pozostają nieodkryte (Friedman – Ohana i in., 1998). Wykazano, że główną helikazą-nukleazą zaangażowaną w naprawę przez homologiczną rekombinację u *Mycobacterium* jest zależna od ATP – AdnAB (Gupta i in., 2011; Sinha i in., 2009), która w przeciwieństwie do RecBCD, nie posiada aktywności rekrutacji RecA w miejsce ssDNA. Proces ten zależny jest dodatkowo od obecności ścieżki RecFOR. Wykazano, że szczep pozbawiony zarówno RecBCD jak i AdnAB wykazuje niewielką przeżywalność po ekspozycji komórek prątków na działanie m.in. promieniowania jonizującego (Gupta i in., 2017; Gupta i in., 2015).



Rycina 2.5. Schemat naprawy DNA przez homologiczną rekombinację u *Mycobacterium*. **A** – Rozpoznanie podwójnego pęknięcia nici DNA przez helikazęnukleazę AdnAB; powstanie jednoniciowych końców 3'. **B** - Wiązanie SSB do jednoniciowych końców DNA; rekrutacja RecA i utworzenie połączeń Holidaya. **C** – Odtworzenie wiązań fosfodiestrowych (na podstawie Singh, 2017).

2.2.5. Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)

W wyniku błędów w replikacji DNA, polimerazy wprowadzać mogą w jego sekwencję nukleotydy, które będą błędnie sparowane z niewłaściwymi zasadami. Częstość występowania błędów podczas replikacji wynosi w przybliżeniu 10⁻⁴/pz, jednak po ich modyfikacji przez egzonukleazy i ponowną syntezę nici DNA przez polimerazę, częstość ta wynosi ok. 10⁻⁷/pz (Iyer i in., 2006). Odpowiedzialny za naprawę takich zmian jest system naprawy błędnie sparowanych zasad (z ang. mismatch repair), ograniczający występowanie mutacji. Dla przykładu, inaktywacja szlaku naprawy MMR prowadzi do 50-1000 – krotnego wzrostu częstości występowania mutacji w komórkach E. coli (Schofield i Hsieh, 2003; Iyer i in., 2006). Kanoniczny szlak naprawy błędnie sparowanych nukleotydów polega na rozpoznawaniu błędnie sparowanych, chemicznie niezmienionych nukleotydów poprzez rozróżnianie nici nowo syntetyzowanej od nici macierzystej (Castañeda-García i in., 2017). Białkami zaangażowanymi w ten system naprawy są białka MutS i MutL, obecne u wielu organizmów, jednak w przypadku promieniowców nie zidentyfikowano ich homologów (Sachadyn, 2014; Banasik i Sachadyn, 2014). Kluczową rolę w naprawie MMR u tych organizmów pełni homolog endonukleazy archeonów – NucS (EndoMS), a jej inaktywacja u *M. smegmatis* prowadzi do zwiększenia częstości mutacji (Castañeda-García i in., 2017).

2.2.6. System naprawy SOS

• LexA/RecA – zależny (Rycina 2.6. A)

Odpowiedź SOS u bakterii stanowi indukowalny system naprawy DNA, w skład którego wchodzą dwa główne białka – LexA oraz RecA (Maslowska i in., 2019; Wipperman i in., 2018). Białko LexA, będące negatywnym czynnikiem transkrypcyjnym (represorem), składa się z C-końcowej domeny katalitycznej (CTD) oraz N-końcowej domeny (NTD), która wiąże się do DNA o ściśle określonej sekwencji – tzw. SOS-box. Sekwencje SOS-box znajdują się w regionach promotorowych regulonu SOS, uniemożliwiając tym samym transkrypcję genów związanych z odpowiedzią SOS (Maslowska i in., 2019; Zhang i in., 2010).

Po uszkodzeniu DNA, białko RecA wiąże się z jednoniciowym DNA tworząc włókno nukleoproteinowe, stymulując auto proteolizę białka LexA, prowadząc do derepresji genów regulonu SOS (Podlesek i Bertok, 2020). Geny znajdujące się w regionach wiążących LexA, będące pod kontrolą układu SOS /LexA u *M. tuberculosis* przedstawia Tabela 2.1. (na podstawie Smollett i in., 2012 oraz mycobrowser.epfl.ch).

Lp.	Nazwa genu	Funkcja białka	Długość (pz)
1.	rv3395c	Nieznana, podobieństwo do RecA	
2.	rv0515	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	1512
3.	rv3776	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	1560
4.	rv0336	Białko należące do rodziny 13E12	1512
5.	rv3370c	Przypuszczalnie polimeraza DNA III DnaE2	3240
6.	6. <i>rv3260c</i> Przypuszczalnie białko regulujące transkrypcję WhiB2		270
7.	rv1378c	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	1428
8.	rv3074	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	1275
9.	rv2737c	Rekombinaza RecA	2373
10.	rv2720	Represor LexA	711
11.	rv1702c	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	1365
12.	rv1000c	Nieznana	618
13.	rv1057	Nieznana	1182
14.	rv2719c	Przypuszczalnie białko membranowe	498
15.	rv2100	Białko należące do rodziny 13E12	1653
16.	rv0071	Przypuszczalnie maturaza	708
17.	rv2594c	Nukleaza RuvC	567
18.	rv0095c	Białko należące do rodziny 13E12	411
19.	rv2579	Dehalogenaza haloalkanowa DhaA	903
20.	rv1588c	Nieznana/Białko należące do rodziny 13E12	669
21.	rv2517c	Nieznana	252
22.	rv2593c	Helikaza RuvA	591

Tabela 2.1. Geny zawierające SOS-box u *M. tuberculosis*.

W przeciwieństwie do *E. coli*, prątki wykorzystują dodatkowy mechanizm odpowiedzi SOS, niezależny od białka LexA (Smollett i in., 2012; Wipperman i in., 2018). Genom *M. tuberculosis* zawiera kasetę kodującą geny *imuA'- imuB/ dnaE2*. ImuA' i ImuB oddziałują z polimerazą DnaE2, stanowiąc system mutagennej naprawy ostatniej szansy (Podlesek i Bertok, 2020).

• LexA/RecA – niezależny (PafBC) (Rycina 2.6. B)

Znaczna część napraw uszkodzeń DNA poprzez system SOS u prątków *Mycobacterium* regulowana jest w sposób LexA/RecA – niezależny. W badaniach przeprowadzonych nad analizą ekspresji genów po ekspozycji hodowli *M. tuberculosis* na działanie mitomycyny C (MMC) wykazano, że w szczepie z niedoborem RecA, nie zaobserwowano ekspresji 21 genów spośród wszystkich 112 ulegających nadekspresji po działaniu tego związku (Rand i in., 2003). Innym przykładem jest *M. smegmatis*, w którym odkryto niezależny od LexA kompleks czynników transkrypcyjnych PafBC, regulujący poziom ekspresji wielu genów po ekspozycji komórek na działanie mitomycyny C (Brzostek i in., 2021; Müller i in., 2018; Fudrini Olivencia i in., 2017). W przypadku regulacji ekspresji genów regulonu SOS przez LexA – zależną ścieżkę, niezbędny jest promotor P2 genu recA. Wykazano natomiast, że szczep *M. tuberculosis* z mutacjami w jego obrębie nadal zdolny jest do ekspresji genu recA po ekspozycji na działanie MMC, ze względu na obecność dodatkowego promotora P1 (Gopaul i in., 2003). W przypadku prątków *M. smegmatis* wykazano, że delecja w obrębie genu *clp* skutkuje obniżoną ekspresją genów zaangażowanych w naprawy DNA wskazując na kluczową rolę ClgR jako regulatora ekspresji genów u tych mikroorganizmów (Gopaul i in., 2003). Ilościowa analiza proteomiczna porównująca szczep M. smegmatis typu dzikiego oraz szczep M. smegmatis ΔpafBC z zastosowaniem techniki iTRAQ wykazała obniżenie ekspresji 54 genów, z czego 11 kodujących białka zaangażowane w naprawy DNA, w tym najsilniej RecA (Fudrini Olivencia i in., 2017). Ponadto dowiedziono, że delecja w obrębie pojedynczych genów $\Delta pafB$ lub Δ*pafC*, nie skutkuje wzrostem poziomu ekspresji *recA*, który kontrolowany jest przez koekspresję obu badanych białek PafB i PafC (Fudrini Olivencia i in., 2017).



Rycina 2.6. Schemat odpowiedzi typu SOS u *Mycobacterium*. **A** – Na drodze LexA – zależnej; w normalnych warunkach wzrostu białko LexA związane z DNA w rejonach operatorowych – kasetach SOS, uniemożliwia transkrypcję genów regulonu SOS; w warunkach powstania jednoniciowych fragmentów DNA RecA wiąże się do ssDNA tworząc włókna nukleo-proteinowe aktywując proteolizę LexA, co umożliwia transkrypcję genów regulonu SOS. **B** – Na drodze LexA – niezależnej, przy udziale czynnika transkrypcyjnego PafBC (na podstawie Müller i in., 2018).

2.2.7. Rodzina peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP)

Białka z rodziny SRAP (peptydazy związane z odpowiedzią SOS, *z ang.* SOS -Response Associated - Peptidases) występują w różnych organizmach, zarówno u niektórych archeonów, wirusów i bakteriofagów jak i eukariotów i większości bakterii (Amidon i Eichman, 2020; Mohni i in., 2019; Thompson i in., 2019; Aravind i in., 2013). Po raz pierwszy białka posiadające domenę SRAP zostały scharakteryzowane u eukariontów. Przeprowadzono badania proteomiczne oparte na spektrometrii mas (MS – *z ang.* Mass Spectrometry), w których poszukiwano białek wiążących metylowane, dwuniciowe substraty DNA (takie jak: 5- hydroksymetylocytozyna, 5- karboksycytozyna i 5- formylocytozyna) w ekstraktach z embrionalnych komórek macierzystych myszy. Wykazano, że jednym z nich identyfikowano należące do rodziny SRAP białko C3Orf37, co sugerowało jego udział w demetylacji DNA (Spruijt i in., 2013; Aravind i in., 2013). W dalszych badaniach udowodniono, że białko to bierze udział w usuwaniu utlenionych przez enzymy TET (Ten – Eleven Eranslocation) pochodnych 5-metylocytozyny na drodze autoproteolizy i sprzężonej z nią aktywacji nukleazy, nacinającej DNA w miejscu ich występowania (Kweon i in., 2017). Dodatkowo wykazano, że niedobór C3Orf37 w embrionalnych komórkach macierzystych myszy (a także w jej kolejnych stadiach rozwojowych), prowadzi do akumulacji 5- hydroksymetylocytozyny, 5- karboksycytozyny i 5- formylocytozyny w ich materiale genetycznym (Kweon i in., 2017).

Do niedawna funkcja białek z rodziny SRAP występujących u prokariotów była bardzo słabo scharakteryzowana. W komórkach E. coli zidentyfikowano należące do tej rodziny białko YedK, które wykazywało silne powinowactwo wiązania się do określonych uszkodzeń DNA – miejsc apurynowych/apirymidynowych (AP/APE) w jednoniciowym DNA (Wang i in., 2019). W innym badaniu udowodniono, że białko YedK może być katalizatorem prowadzącym do konwersji miejsca AP do jego reaktywnej formy aldehydowej z otwartym pierścieniem, a także może oddziaływać z wielonienasyconymi aldehydami przy końcach 3' w DNA (Paulin i in., 2022). Udowodniono również, że zarówno YedK jak i ludzkie białko zawierające domenę SRAP, wiążące 5 – hydroksymetylocytozynę – HMCES (z ang. 5 – hydroxymethylocytosine binding ES - cell - specific protein) posiadają aktywność bezpośredniej regeneracji miejsc AP poprzez rewersję wiązań DNA – białko, stabilizujących takie miejsca (Paulin i in., 2022). Połączenie takie możliwe jest poprzez kowalencyjne wiązanie się z DNA konserwatywnej cysteiny występującej na N – końcu tych białek (Mohni i in., 2019; Thompson i in., 2019). Schemat naprawy wynikających z krzyżowego wiązania białek z DNA u bakterii nie został scharakteryzowany, jednak przeprowadzono badania wskazujące na możliwość uczestnictwa szlaku naprawy NER oraz RecBCD – zależnej rekombinacji homologicznej w usuwaniu takich struktur (Nakano i in., 2007).

Przeprowadzono również oparte na spektrometrii mas badania, w których mykobakteryjne białko Msmeg_1891 (*M. smegmatis*), należące do rodziny SRAP, wiązało się do substratów DNA przypominających pojedyncze i podwójne pęknięcia nici (Płociński i in., 2017). Co więcej, homolog tego białka występujący u patogennych prątków *M. tuberculosis* (Rv3226c), był jednym z najsilniej wiążących się z RNA białek, w badaniach nad mykobakteryjnym degradosomem (Płociński i in., 2019), pomimo jego dość niskiego podstawowego poziomu ekspresji w komórkach tych bakterii (11- 46 ppm, PAXDb, <u>https://paxdb.org/protein/83332/8820644</u>).

3. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie funkcji białka Msmeg_1891 (oraz jego homologa Rv3226c), zawierającego domenę proteazy związaną z odpowiedzią SOS (SRAP; *z ang.* SOS Response Associated- Peptidase) potencjalnie zaangażowanego w proces naprawy uszkodzeń DNA u prątków z rodzaju *Mycobacterium*.

Cel ten był realizowany przez następujące cele cząstkowe:

- Konstrukcję mutantów delecyjnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, pozbawionych funkcjonalnych białek Msmeg_1891 i Rv3226c.
- Konstrukcję mutanta *M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji genu msmeg_1891 z wykorzystaniem metody CRISPRi/dCas9.
- Analizy fenotypowe szczepów kontrolnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* oraz otrzymanych mutantów, zmierzające do określenia udziału badanych białek w naprawach uszkodzeń DNA po ekspozycji hodowli na wybrane czynniki genotoksyczne.
- Oczyszczenie preparatów rekombinowanego białka Msmeg_1891 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym (HIS-tag), oraz przygotowanie surowicy odpornościowej anty-Msmeg_1891.
- Określenie zdolności wiązania się białka Msmeg_1891 do jednoniciowych i dwuniciowych substratów DNA oraz RNA, oraz substratów zawierających uszkodzenia lub syntetycznie wprowadzone rybonukleotydy i uracyl.
- Poszukiwanie białek partnerskich dla białka Msmeg_1891 z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa sprzężonej ze spektrometrią mas.
- Ocenę poziomu ekspresji genu *msmeg_1891* i poziomu białka Msmeg_1891 po ekspozycji hodowli na działanie wybranych czynników genotoksycznych .
- Globalną analizę transkryptomiczną *M. tuberculosis* Δ*rv3226c* po ekspozycji na działanie wybranych czynników genotoksycznych.

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Tabela 3.1. Katalog szczepów bakteryjnych wykorzystanych w pr	racy.
--	-------

Gatunek	Nazwa szczepu	Genotyp/charakterystyka	Źródło
E. coli	TOP 10	F', mcrA, Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-leu), 7697 galU, galK, rpsL (StrR), endA1, nupG.	Thermo Fisher
E. coli	BL21 (DE 3)	F', ompT, gal, dcm, lon, hsdS _B (r_{B} - m_{B} -), (malB ⁺), κ -12(λ ^S).	Novagen
E. coli	Rosetta	F', ompT, hsdS _B (r _{B⁻} m _{B⁻}), gal, dcm (DE3), pRARE (CamR).	Novagen
M. tuberculosis	H37Rv	Szczep referencyjny, wirulentny.	PGiFM IBM PAN, Łódź
M. tuberculosis	∆rv3226c	Szczep z delecją w obrębie genu <i>rv3226c</i> .	Niniejsza praca doktorska
M. tuberculosis	Δrv3226c :: P _{own} rv3226c	Szczep z delecją w obrębie genu <i>rv3226c</i> komplementowany natywnym <i>rv3226c</i> na wektorze pMV306 (Km ^R).	Niniejsza praca doktorska
M. smegmatis	mc ² 155	ATCC 700084, szczep dziki.	Instytut Medycyny Tropikalnej, Antwerpia, Belgia
M. smegmatis	<i>M. smegmatis –</i> pLJR962	Szczep z integracyjnym wektorem pLJR962, wykorzystywany do obniżania poziomu ekspresji genu docelowego.	PGiFM IBM PAN, Łódź
M. smegmatis	ΔendoIV	Szczep z delecją w obrębie genu <i>endoIV</i> .	PGiFM IBM PAN, Łódź

M. smegmatis	∆ku	Szczep z delecją w	PGIFM IBM PAN,
		obrębie genu <i>ku</i> .	Łódź
M. smegmatis	∆ligD	Szczep z delecją w	PGIFM IBM PAN,
		obrębie genu <i>ligD</i> .	Łódź
M. smegmatis	$\Delta(ligC_1C_2, prim2)$	Szczep z delecją w	PGIFM IBM PAN,
		obrębie genów <i>ligC</i> ₁ C ₂ i	Łódź
		prim2.	
M. smegmatis	$\Delta(ku, ligD, ligC_1C_2,$	Szczep z delecją w	PGiFM IBM PAN,
	prim2)	obrębie genów: <i>ku, ligD,</i>	Łódź
		ligC ₁ C ₂ ,	
		i prim2.	
M. smegmatis	M. smegmatis –	Szczep z obniżoną	Niniejsza praca
	pLJR962 -	ekspresją genu	doktorska
	\downarrow msmeg_1891	msmeg_1891.	
M. smegmatis	∆ <i>msmeg_</i> 1891	Szczep z delecją w	Niniejsza praca
		obrębie genu	doktorska
		msmeg_1891.	
M. smegmatis	∆msmeg_1891 ::	Szczep z delecją w	Niniejsza praca
	P _{own} msmeg_1891	obrębie genu	doktorska
		msmeg_1891	
		komplementowany	
		natywnym <i>msmeg_1891</i>	
		na wektorze pMV306	
		(Km ^R).	
M. smegmatis	∆mpg	Szczep z delecją w	Niniejsza praca
		obrębie genu <i>mpg</i> .	doktorska
M. smegmatis	∆(<i>msmeg_</i> 1891,	Szczep z delecją w	Niniejsza praca
	mpg)	obrębie genów	doktorska
		msmeg_1891	
		i mpg.	
M. smegmatis	∆(<i>msmeg_</i> 1891,	Szczep z delecją w	Niniejsza praca
	endoIV)	obrębie genów	doktorska
		msmeg_1891	
		i endoIV.	
M. smegmatis	Δ(<i>msmeg_</i> 1891,	Szczep z delecją	Niniejsza praca
	mpg, endoIV)	w obrębie genów	doktorska
		msmeg_1891,	
		mpg i endoIV.	

M. smegmatis	Δ(msmeg_1891, ku)	Szczep z delecją	Niniejsza praca
		w obrębie genów	doktorska
		msmeg_1891 i ku.	
M. smegmatis	∆(<i>msmeg_</i> 1891,	Szczep z delecją	Niniejsza praca
	ligD)	w obrębie genów	doktorska
		msmeg_1891	
		i <i>ligD</i> .	
M. smegmatis	∆(msmeg_1891,	Szczep z delecją	Niniejsza praca
	ligC1C2, prim2)	w obrębie genów	doktorska
		<i>msmeg_</i> 1891, <i>ligC</i> ₁C₂ i	
		prim2.	
M. smegmatis	Δ(msmeg_1891, ku,	Szczep z delecją	Niniejsza praca
	ligD, ligC ₁ C ₂ , prim2)	w obrębie genów:	doktorska
		msmeg_1891, ku, ligD,	
		ligC1C2,	
		i prim2.	

3.2. Syntetyczne oligonukleotydy

 Tabela 3.2.
 Katalog syntetycznych oligonukleotydów wykorzystanych do amplifikacji DNA.

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa 5' – 3'	Zastosowanie		
Oligonukleotydy wykorzystane do obniżania poziomu ekspresji genu msmeg_1891				
CRISP_MS1891_M_ R	AAACATGTACGGCGTCGACGGTGAGC	Sekwencja oligonukleotydow a do obniżania poziomu ekspresji genu <i>msmeg_1891,</i> system CRISPRi/dCas9		
CRISP_MS1891_M_ F	GGGAGCTCACCGTCGACGCCGTACAT			
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji fragmentów DNA				
LJR_TetR_r	CACGGCGTGGTGGTGGTGGT	Amplifikacja fragmentu		
LJR_Cas9_s	GATCGAGATGGCCCGCGAGA	TetR/Cas9		

		z plazmidu pLJR962.
Ms1891GR1-PstI-s	GCTGCAGTCCGGCCGGTTCTTGGTGC	Amplifikacja
Ms1891GR2-HindIII- r	CAAGCTTGATCTTCTGGGCCAGCAGCGC	powyżej 5' końca <i>msmeg_1891,</i> o wielkości 1538 pz.
Ms1891GR3-HindIII- s	CAAGCTTCTGCGGACGGCAAGAAGGC	Amplifikacja fragmentu DNA
Ms1891GR4- natKpnl-r	GCGTTGGCGTCGACTCCGT	poniżej 3' końca <i>msmeg_1891</i> o wielkości1818 pz.
Ms3759GR1-Scal-s	CAGTACTGCTCGTCGAGGACCAGCAGTTCG	Amplifikacja fragmentu DNA
Ms3759GR2-HindIll- r	CAAGCTTACGAGGTGGGCGCCGATCA	powyżej 5' końca <i>mpg,</i> o wielkości 1508 pz.
Ms3759GR3-Hindll- s	CAAGCTTACGGAGTCGACAGTGCACAGCGT	Amplifikacja fragmentu DNA
Ms3759GR4- KpnInat-r	CGGCCGTGTTGACGAAGTACTGG	poniżej 3' końca <i>mpg,</i> o wielkości 1124 pz.
Rv3226cGR1-Scal-s	CAGTACTACAGGTCACCGACCACGTCCAC	Amplifikacja fragmentu DNA powyżej 5' końca
Rv3226cGR2HindIII- r	CAAGCTTCACCCGGTGGCCTCGTCTATG	<i>rv3226c,</i> o wielkości 1730 pz.
Rv3226cGR3- HindIII-s	CAAGCTTAGACGCCGTTCTTCCTGCACC	Amplifikacja fragmentu DNA poniżej 3' końca
Rv3226cGR4-Kpnl-r	CGGTACCGCCGGACCTGATCACCTT	<i>rv3226c,</i> o wielkości 1944 pz.

Oligonukleotydy wykorzystane jako sondy genetyczne w hybrydyzacji Southern blot				
Ms1891-BamHI-s	CGGATCCATGTGTGGACGTTTCGCGGTCAC	Potwierdzenie genotypu mutanta <i>M. smeamatis</i> -		
Ms1891-Xbal-r	CTCTAGATTAAAACAGCCCAGCCTGTTCGGCC	$\Delta msmeg_1891.$		
Ms3759-BamHI-s	CGGATCCATGAGCGTCGACCTGCTGACCG	Potwierdzenie		
Ms3759-Xbal-r	CTCTAGATTAGTCACTGCTGCCGGGCGCC	genotypu mutanta <i>M. smegmatis-</i> Δmpg.		
Rv3226c-Bglll-s	CAGATCTATGTGCGGACGGTTTGCGGTC	Potwierdzenie		
Rv3226c-Xbal-r	CTCTAGATTACAGCAGCTGGATCTGCTCGGG	genotypu mutanta <i>M. tuberculosis</i> Δrv3226c.		
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji genów do nadprodukcji białek				
Ms1891_Rev_61C_X hol _N-term	CTCGAGTCAAAACAGCCCAGC CTGTTCG	Amplifikacja genu msmeg_1891		
Ms1891_For_64C_N del _N-term	CATATGTGTGGACGTTTCGCGGTCAC	w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym przy N- końcu.		
Ms1891_Rev_61C_X hol _C-term	CTCGAGAAACAGCCCAGCCTG TTCG	Amplifikacja genu msmeg_1891		
Ms1891_For_64C_X ba _C-term	TCTAGAAATAATTTTGTTTAAC TTTAAGAAGGAGATATACCAT GTGTGGACGTTTCGCGGTCAC	w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym przy C-końcu.		
Ms3883-BglII-s	CAGATCTGGTGGTGTGTGACATCGACGTCGAG	Amplifikacja genu		
Ms3883-HindIII-r	CAAGCTTAGTCGGGCAGCTGGTCCAGTG	msmeg_3883 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym przy N- końcu.		
Ms0866-BglII-s	CAGATCTGGTGCGGGCTGACTCGGCGC	Amplifikacja genu		
Ms0866-HindIII-r	CAAGCTTAGGGGTTGAGCCTGCGGACC	msmeg_0866 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym przy N- końcu.		
Tabela 3.3. Katalog syntetycznych oligonukleotydów wykorzystanych do testówbiochemicznych i testów oddziaływania z DNA.

Znakowane fluorescencyjnie sekwencje oligonukleotydowe wykorzystane do analiz biochemicznych		
Nazwa	Sekwencja nukleotydowa 5'- 3'	
ssDNA	(HEX)GCACGGCGTGTTCTTCCGACAACGTTCTTAAAAAAACTT	
RNA	(HEX)*G*C*A*C*G*G*C*G*U*G*U*U*C*U*U*C*C*G*A*C*A*A*C*G*U*U* C* U*U*A*A*A*A*A*A*A*C*U*U *- wiązanie tiofosforanowe zamiast fosforanowego	
ds- linear-f	(HEX)TCAGCGAACTCACTGATCCAGTCTTAGCATCAGTCACGATACCTCGAG ATACATACG	
ds- linear-r	(Cyanine 5)CGTATGTATCTCGAGGTATCGTGACTGATGCTAAGACTGGATCAG TGAGTTCGCTGA	
ss- 50mer	(HEX)CGCAAAACAACGAAAGACAACGAAGGTGAGACAAGGCATATAGCATTAGC	
dU	(Cyanine5)GCTAATGCTATATGCCTTGTCTCACCUTCGTTGTCTTTCGTTGTTTTGCG	
rC	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC)(dA)(dC) C (dT)(dT)(dC)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC	
rA	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC) A (dC)(dC)(dT)(dT)(dC)(dG)(dT)(dT)(dC)(dT)(dT)(dT)(dC)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dT)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC	
rr	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC) AC (dC)(dT)(dT)(dC)(dG)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dT)(dC)(d G)(dT)(dT)(dG)(dT)(dG)(dC)	
rG	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC)(dA)(dC)(dC)(dT)(dT)(dC) G (dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dT)(dT)(dC))(dG)(dT)(dT)(dG)(dT)(dG)(dC)	
rCAm	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC)(dA)(dC)(dC) C (dT)(dC)(dG)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dT)(dT)(dC))(dG)(dT)(dT)(dG)(dT)(dG)(dC)	
rAAm	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC)(dA)(dC)(dC) A (dT)(dC)(dG)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC	
rGTm	(Cyanine5)(dA)(dA)(dT)(dG)(dC)(dT)(dA)(dT)(dA)(dT)(dG)(dC)(dC)(dT)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dC) G (dC)(dC)(dT)(dT)(dC)(dG)(dT)(dG)(dT)(dC)(dT)(dT)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dT)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC)(dC	

3.3. Wektory plazmidowe

Nazwa	Charakterystyka	Źródło		
Komercyjne wektory plazmidowe				
pJET1.2/blunt	Wektor służący do klonowania produktów PCR; Ap ^R	Thermo Scientific		
p2NIL	Niereplikujący się u mykobakterii, rekombinacyjny wektor, zawierający system replikacji ColE1; Km ^R	Parish i Stoker, 2000		
pGOAL17	Wektor posiadający kasetę markerową, zawierającą geny <i>sacB</i> i <i>lacZ</i> ; Ap ^R	Parish i Stoker, 2000		
pMV306km	Integracyjny, mykobakteryjny wektor posiadający gen kodujący integrazę faga L5; Km ^R	MedImmune Inc.		
p⊔R962	Wektor integracyjny, wykorzystywany do obniżania poziomu ekspresji genu docelowego; Km ^R	Addgene		
pET-28a	Wektor z indukowalnym promotorem P _{τ7} , umożliwiający ekspresję rekombinowanych białek w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym; Km ^R	Novagen		
Rekom	binowane plazmidy do manipulacji genetycznych w kor	nórkach		
	M. smegmatis	Γ		
pFG7	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem DNA powyżej 5' końca <i>msmeg_1891</i> o wielkości 1538 pz, ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne Pstl i HindIII; Ap ^R	Niniejsza praca doktorska		
pFG8	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem DNA poniżej 3' końca <i>msmeg_1891</i> o wielkości 1818	Niniejsza praca doktorska		

 Tabela 3.4. Katalog plazmidów wykorzystanych w pracy.

	pz, ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi		
	przez enzymy restrykcyjne HindIII i KpnI; Ap ^R		
	Wektor p2NIL z wklonowanym fragmentem DNA		
nEG9	powyżej 5' końca <i>msmeg_1891</i> o wielkości 1538 pz,	Niniejsza praca	
pros	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska	
	enzymy restrykcyjne Pstl i HindIII; Km ^R		
	Wektor pFG9 z wklonowanym fragmentem DNA		
nEG10	poniżej 3' końca <i>msmeg_1891</i> o wielkości 1818 pz,	Niniejsza praca	
pi 010	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska	
	enzymy restrykcyjne HindIII i KpnI; Km ^R		
	Wektor pFG10 z wklonowaną kasetą markerową	Ninieisza nraca	
pMS1	noszącą geny <i>sacB</i> i <i>lacZ</i> , pochodzącą z wektora	doktorska	
	pGOAL17; Km ^R	UUKIUISKa	
	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem		
	DNA powyżej 5' końca mpg	Niniejsza praca doktorska	
pFG11	o wielkości 1508 pz, ograniczonym sekwencjami		
	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne Scal		
	i HindIII; Ap ^R		
	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem		
	DNA poniżej 3' końca mpg	Ninioisza praca	
pFG12	o wielkości 1124 pz, ograniczonym sekwencjami	doktorska	
	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne HindIII i	uoktorsku	
	Kpnl; Ap ^R		
	Wektor p2NIL z wklonowanym fragmentem DNA		
	powyżej 5' końca <i>mpg</i>	Ninieisza praca	
pFG13	o wielkości 1508 pz, ograniczonym sekwencjami	doktorska	
	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne Scal i	uontorshu	
	HindIII; Km ^R		
	Wektor pFG13 z wklonowanym fragmentem DNA	Ninieisza praca	
pFG14	poniżej 3' końca <i>mpg</i>	doktorska	
	o wielkości 1124 pz, ograniczonym sekwencjami		

	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne HindIII i	
	Kpnl; Km ^R	
	Wektor pFG14 z wklonowaną kasetą markerową	Ninieisza praca
pMPG1	noszącą geny <i>sacB</i> i <i>lacZ</i> , pochodzącą z wektora	doktorska
	pGOAL17; Km ^R	UUKIUISKa
	Wektor pMV306km z wklonowanym fragmentem	
	DNA kodującym <i>msmeg_1891</i> wraz z sekwencją	Ninieisza praca
pFG15	promotorową, ograniczonym sekwencjami	doktorska
	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne Xbal i	UUKLUISKA
	HindIII; Km ^R	
Rekom	binowane plazmidy do manipulacji genetycznych w ko	nórkach
	M. tuberculosis	
	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem	
nEG16	DNA powyżej 5' końca <i>rv3226c</i> o wielkości 1730 pz,	Niniejsza praca
pi 010	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska
	enzymy restrykcyjne Scal i HindIII; Ap ^R	
	Wektor pJET1.2/blunt z wklonowanym fragmentem	
nEG17	DNA poniżej 3' końca <i>rv3226c</i> o wielkości 1944 pz,	Niniejsza praca
pron	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska
	enzymy restrykcyjne HindIII i KpnI; Ap ^R	
	Wektor p2NIL z wklonowanym fragmentem DNA	
nEC19	powyżej 5' końca <i>rv3226c</i> o wielkości 1730 pz,	Niniejsza praca
proto	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska
	enzymy restrykcyjne Scal i HindIII; Km ^R	
	Plazmid pFG18 z wklonowanym fragmentem DNA	
nEG19	poniżej 3' końca <i>rv3226c</i> o wielkości 1944 pz,	Niniejsza praca
prois	ograniczonym sekwencjami rozpoznawanymi przez	doktorska
	enzymy restrykcyjne HindIII i KpnI; Km ^R	
	Plazmid pFG19 z wklonowaną kasetą markerową	Ninieisza praca
pMT1	noszącą geny <i>sacB</i> i <i>lacZ</i> , pochodzącą z wektora	doktorska
	pGOAL17; Km ^R	

	Wektor pMV306km z wklonowanym fragmentem		
	DNA kodującym <i>rv3226c</i> wraz z sekwencją	Niniejsza praca doktorska	
pFG22	promotorową, ograniczonym sekwencjami		
	rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne Xbal i	UUKIUISKA	
	HindIII; Km ^R		
Rekom	binowane plazmidy do nadprodukcji białek w komórka	ch <i>E. coli</i>	
	Wektor pJET1.2/blunt noszący fragment DNA		
	kodujący <i>msmeg_1891</i> w fuzji	Ninieisza praca	
pFG3	N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym,	doktorska	
	ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez		
	enzymy restrykcyjne Ndel i Xhol; Ap ^R		
	Wektor pJET1.2/blunt noszący fragment DNA		
	kodujący <i>msmeg_1891</i> w fuzji	Ninieisza praca	
pFG4	C- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym,	doktorska	
	ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez	uoktorsku	
	enzymy restrykcyjne Xbal i Xhol; Ap ^R		
	Wektor pET-28a noszący fragment DNA kodujący	Ninieisza praca	
pFG5	msmeg_1891 w fuzji	doktorska	
	N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym; Ap ^R	uoktorsku	
	Wektor pET-28a noszący fragment DNA kodujący	Ninieisza praca	
pFG6	msmeg_1891 w fuzji	doktorsko	
	C- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym; Ap ^R	UUKIUISKU	
	Wektor pJET1.2/blunt noszący fragment DNA		
	kodujący <i>msmeg_0866</i> w fuzji	Ninieisza praca	
pFG20	N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym,	doktorska	
	ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez	GORTOTSKA	
	enzymy restrykcyjne BgllI i HindIII; Ap ^R		
	Wektor pHIS noszący fragment DNA kodujący	Ninieisza praca	
pBP1	msmeg_0866 w fuzji	doktorska	
	N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym; Ap ^R	UUKLUISKA	

pFG21	Wektor pJET1.2/blunt noszący fragment DNA kodujący <i>msmeg_3883</i> w fuzji N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez	Niniejsza praca doktorska
	enzymy restrykcyjne Bglll i HindIII; Ap ^R	
	Wektor pHIS noszący fragment DNA kodujący	Niniejsza praca
pBP2	<i>msmeg_3883</i> w fuzji N- końcowej ze znacznikiem polihistydynowym; Ap ^R	doktorska

3.4. Enzymy

- enzymy wykorzystane do amplifikacji DNA
 - polimeraza DNA AccuPrime Pfx (Invitrogen)
 - polimeraza DNA Taq (Sigma)
- enzymy wykorzystane do łączenia fragmentów DNA (ligacja)
 - ligaza DNA T4 (Thermo Scientific)
- enzymy wykorzystane do trawienia RNA
 - RNAza (Sigma)
- enzymy wykorzystane do trawienia peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii
 lizozym (Sigma)
- enzymy restrykcyjne FastDigest[™] (Fermentas) (Tabela 3.5.)

Nazwa enzymu	Pochodzenie bakteryjne	Rozpoznawana sekwencja nukleotydowa 5'-3' wraz z miejscem przecinania
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens	G G A T C C C C T A G G
Bglii	Bacillus globigii	G T C T A C T A G T C T A G
BsmBl	Bacillus stearothermophilus	
HindIII	Haemophilus influenzae R _d	A A G C T T T T C G A A
Kpnl	Klebsiella pneumoniae OK8	G G T A C C C C A T G G
Ndel	Neisseria denitrificans	
Pacl	Pseudomonas alcaligenes	T T A A T T A A A A T T A A T T

 Tabela 3.5.
 Katalog enzymów restrykcyjnych wykorzystanych w pracy.

Pstl	Providencia stuartii	
Scal	Streptomyces caespitosus	A G T A C T T C A T G A
Xbal	Xanthomonas badrii	
Xhol	Xanthomonas holcicola	C T C G A G G A G C T C

3.5. Mieszaniny reakcyjne

•	Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)	
	DNA matrycowy	50 ng
	10 x stężony bufor	5 µl
	DMSO (Sigma)	3%
	dNTP mix 2,5 mM (Thermo Scientific)	zgodnie z zaleceniami producenta
	sekwencje oligonukleotydowe	zgodnie z zaleceniami producenta
	Polimeraza DNA	zgodnie z zaleceniami producenta
	H ₂ O	do 50 µl
•	Łączenie fragmentów DNA (ligacja)	
	Wektor plazmidowy	100 ng
	DNA klonowany	500 ng
	10 x stężony bufor	2 µl

Ligaza DNA T4	1 U
H ₂ O	do 20 µl

Trawienie enzymami restrykcyjnymi	
DNA	1 µg
10 x stężony bufor	5 µl
Enzym	1 U
H ₂ O	do 50 µl

Test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym

do 20 µl

EMSA (z ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay)		
DNA znakowany (HEX/Cy5)	12 nM	
DNA nieznakowany (opcjonalnie)	12 nM	
10 x stężony bufor EMSA	2 µl	
Białko	do 1 µM	
Sacharoza 60%	1,3 µl	

H₂O

3.6. Bufory i roztwory

٠

3.6.1. Bufory i roztwory wykorzystane w procesie elektroforezy

Bufor do elektroforezy w żelach agarozowych TAE (50 x stężony)
 Tris – HCL (BioShop)
 2 M

rrs - rcr (Bioshop)	
EDTA (Sigma)	50 mM
CH₃COOH (POCH)	1 M
pH = 8,0	

• Bufor do elektroforezy białek w żelach poliakrylamidowych TGB

(10 x stężony)	
Tris (Bioshop)	200 mM
Glicyna (Sigma)	250 mM
SDS (BioShop)	10%

• Bufor do rozdziałów elektroforetycznych reakcji białko – DNA TBE

(10 x stężony)	
Tris (Bioshop)	890 mM
EDTA (Sigma)	20 mM
Kwas borowy (POCH)	890 mM
рН = 8,3	

• Bufor do reakcji białko – DNA w warunkach denaturujących UREA – PAGE

Tris – HCl (Bioshop)	20 mM
DTT (Sigma)	1 mM
EDTA (Sigma)	1 mM

3.6.2. Bufory obciążające

•	Bufor do obciążania DNA (6 x stężony)	
	Glicerol (Bioshop)	60%
	Błękit bromofenolowy	0,25%

• Bufor do obciążania białek (4 x stężony)

Tris – HCl (Bioshop)	250 mM
Glicerol (Bioshop)	40%
Błękit bromofenolowy	0,4%
SDS (BioShop)	8%
DTT (Sigma)	400 mM
рН = 6,8	

• Bufor do obciążania reakcji w denaturujących żelach poliakrylamidowych

(2 x stężony)	
Formamid	95%
EDTA (Sigma)	0,5%
Błękit bromofenolowy	0,1%

3.6.3. Bufory do oczyszczania białek w fuzji ze znacznikiem HIS

3.6.3.1. Bufory do oczyszczania białek z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa

- Bufor A (wiążący i płuczący)
 Tris HCl (BioShop) 50 mM
 NaCl (BioShop) 1 M
 Imidazol (Sigma) 10 mM
 Triton X 100 (Sigma) 0,1%
 Glicerol (Bioshop) 10%
 pH = 7,6
- Bufor B (elucyjny)

Tris – HCl (BioShop)	50 mM
NaCl (BioShop)	0,5 M
Imidazol (Sigma)	0,5 M
Glicerol (BioShop)	10%
pH = 7,6	

• Bufor do lizy

Bufor A	10 ml
Lizozym	0,1 mg/ml
Koktajl inhibitorów proteaz (Thermo Scientific)	0,01 mg/ml
PMSF (BioShop)	1 mM
RNAza A (Sigma)	100 µg/ml
DENARASE	1 U

3.6.3.2. Bufory do oczyszczania białek z wykorzystaniem systemu AKTA – Start

• Oczyszczanie z wykorzystaniem kolumny jonowymiennej

Bufor A

Tris – HCl (BioShop)	50 mM
----------------------	-------

NaCl (BioShop)	50 mM
Glicerol (BioShop)	10%
рН = 6,8	
Bufor B	
Tris – HCl (BioShop)	50 mM
NaCl (BioShop)	1 M
Glicerol (BioShop)	10%
pH = 6,8	

• Oczyszczanie z wykorzystaniem kolumny do filtracji żelowej

Bufor A	
Tris – HCl (BioShop)	50 mM
NaCl (BioShop)	150 mM
Glicerol (BioShop)	10%
pH = 6,8	

3.6.4. Bufory i roztwory wykorzystane w metodzie western blot

•	Bufor wyjściowy (10 x stężony)		
	Tris – HCl (BioShop)	250 mM	
	Glicyna (Sigma)	1,92 M	
	pH = 8,3		

• Bufor do transferu

Bufor wyjściowy 1 x (rozcieńczony 20% metanolem)

• Bufor TBS

Tris – HCl (BioShop)	50 mM
NaCl (BioShop)	200 mM
pH = 7,4	

• Bufor TBS-T

Bufor TBS Tween 20 (BioShop) pH = 7,4

0,05%

Bufor blokujący

10% mleko w buforze TBS

Bufor do rozcieńczania przeciwciał 10% mleko w buforze TBS-T

Roztwór poliwalentnej, króliczej surowicy skierowanej przeciwko białku Msmeg_1891

Surowicę uzyskano dzięki współpracy z dr hab. Bożeną Dziadek, prof. UŁ, z Katedry Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. W metodzie western blot surowicę rozcieńczano 1:6400.

 Roztwór kozich przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową, skierowanych przeciwko immunoglobulinom króliczym

Przeciwciała komercyjne (Dako). W metodzie western blot przeciwciała rozcieńczano 1:1000.

Roztwór ECL do wywoływania reakcji chemiluminescencji
 Dostępna komercyjnie (Cyanagen) mieszanina związków (w stosunku 1:1).

3.6.5. Bufory wykorzystane w przygotowaniu komórek kompetentnych E. coli

Bufor I

 CH₃COOK (Sigma)
 MnCl₂ (Sigma)
 MnCl₂ (Sigma)
 RbCl (Sigma)
 CaCl₂ (Sigma)
 Glicerol (BioShop)
 pH = 8

• Bufor II

NaMOPS (POCH)	10 mM
CaCl ₂ (Sigma)	75 mM
RbCl (Sigma)	10 mM
Glicerol (BioShop)	15%
pH = 7	

3.6.6. Bufory wykorzystane w metodzie Southern blot

•	Bufor do depurynacji	
	HCI	250 mM
•	Bufor do denaturacji	
	NaCl (BioShop)	1,5 M
	NaOH (Sigma)	0,5 M
•	Bufor do neutralizacji	
	NaCl (BioShop)	1,5 M
	Tris – HCl (BioShop)	0,5 M
	pH = 7,5	
•	Bufor SSC (20 x stężony)	
	Cytrynian sodu (Merck)	0,3 M
	NaCl (BioShop)	3 M
•	Bufor do hybrydyzacji	
	NaCl (BioShop)	0,5 M
	Odczynnik blokujący (GE Healthcare)	4%
•	Bufor przemywający I	
•	Noll DO ril = 7 (Sizmo)	
	$NaH_2PO_4 pH = 7$ (Sigma)	50 mivi
	Mocznik (BioShop)	2 M
	SDS (BioShop)	0,1%

MgCl ₂ (BioShop)	1 mM
Odczynnik blokujący (GE Healthcare)	0,2%
Bufor przemywający II (20 x stężony)	
NaCl (BioShop)	2 M
Tris – HCl (BioShop)	1 M
pH = 10	
	MgCl ₂ (BioShop) Odczynnik blokujący (GE Healthcare) Bufor przemywający II (20 x stężony) NaCl (BioShop) Tris – HCl (BioShop) pH = 10

•	Bufor przemywający II (1x stężony)		
	Bufor przemywający II (20 x stężony)	rozc. 20 x	
	MgCl ₂ (BioShop)	0,2 mM	

3.6.7. Bufory wykorzystane do otrzymywania kompleksów białkowych na złożu anty – FLAG

•	Bufor A (płuczący)	
	PBS pH = 7,4 (BioShop)	1 x
	Triton X – 100 (Sigma)	0,1%
•	Bufor B (lizujący)	
	PBS pH = 7,4 (BioShop)	1 x
	Triton X – 100 (Sigma)	0,5%
	PMSF (BioShop)	1 mM
	DTT (Sigma)	1 mM
	RNAza (Sigma)	100 µg/ml
	DNAza (Sigma)	10 µg/ml
•	Bufor C (elucyjny)	

PBS pH = 7,4 (BioShop) 1 x

• Bufor do precypitacji

Czerwień pirogalolu (Sigma)	0,05 mM
Molibdenian sodu (Sigma)	0,16 mM
Szczawian sodu (Sigma)	1 mM
Kwas bursztynowy (Merck)	50 mM

3.6.8. Pozostałe bufory i roztwory

•	Bufor PBS	
	NaCl (BioShop)	100 mM
	Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	80 mM
	NaH ₂ PO ₄ (Sigma)	20 mM
	pH = 7,5	

• Bufor PBST

PBS pH = 7,4 (BioShop)	1 x
Tween 80 (BioShop)	0,05%

Mieszanina do ekstrakcji chromosomalnego DNA Chloroform : alkohol izoamylowy 24:1

• Bufor do łączenia oligonukleotydów (z ang. annelling)

Tris (BioShop)	20 mM
NaCl (BioShop)	50 mM
pH = 7,5	

• Bufor TE

Tris – HCl (BioShop)	pH = 8	10 mM
EDTA (Sigma) pH = 8		1 mM

• Bufor EMSA (10 x stężony)

Tris – HCl (BioShop)	pH = 7	50 mM
----------------------	--------	-------

NaCl (BioShop)	250 mM
Glicerol (BioShop)	20%
DTT (Sigma)	10 mM

• Bufor do oczyszczania przeciwciał

Tris (BioShop)	500 mM
NaCl (BioShop)	1,5 M
NaN₃ (Sigma)	0,5%
pH = 7,4	

3.7. Żele do rozdziału elektroforetycznego

- Żel agarozowy do rozdziału fragmentów DNA o wielkości od 100 do 500 pz
 Agaroza w buforze TAE (1 x stężony)
 Bromek etydyny
 0,5 μg/ml
- Żel agarozowy do rozdziału fragmentów DNA o wielkości > 250 pz
 Agaroza w buforze TAE (1 x stężony) 1%

Bromek etydyny	0,5 μg/ml

• Żel poliakrylamidowy do rozdziału białek (rozdzielający)

Akrylamid (BioShop)	12%
Tris – HCl pH = 8,8 (BioShop)	0,36 M
SDS (BioShop)	0,1%
APS (Sigma)	0,1%
TEMED (Bio - Rad)	0,1%

Żel poliakrylamidowy do rozdziału białek (zatężający)
 Akrylamid (BioShop)
 Tris – HCl pH = 6,8 (BioShop)
 D,1 M
 SDS (BioShop)
 0,1%

APS (Sigma)	0,1%
TEMED (Bio - Rad)	0,1%

•	Żel poliakrylamidowy do rozdziału EMSA	
	Akrylamid (BioShop)	4%
	ТВЕ	0,5 x stężony
	APS (Sigma)	0,1%
	TEMED (Bio - Rad)	0,1%

• Żel poliakrylamidowy do rozdziału fragmentów DNA z dokładnością do 1 nt

Akrylamid (BioShop)	15%
ТВЕ	1 x stężony
Mocznik (BioShop)	7 M
APS (Sigma)	0,1%
TEMED (Bio - Rad)	0,1%

3.8. Standardy wielkości

- Standardy wielkości DNA
 - GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) mieszanina fragmentów
 DNA o wielkościach: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz.
 - GeneRuler[™] 100 pz DNA Ladder (Thermo Scientific) mieszanina fragmentów DNA o wielkościach: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz.

• Standardy wielkości białek

- PageRuler[™] Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) mieszanina rekombinowanych białek o wielkościach: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 250 kDa.
- PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) mieszanina rekombinowanych białek o wielkościach: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 180 kDa.

3.9. Podłoża mikrobiologiczne

•	Podłoże LB płynne (bulion lizogenny)	
	Trypton (BioShop)	10 g/L
	Ekstrakt z drożdży (BioShop)	5 g/L
	NaCl (BioShop)	5 g/L

• Podłoże LB płynne wzbogacone solami

Podłoże LB (płynne)	
Na2SO4 (Sigma)	0,5 M
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0,5 M
Na_2HPO_4 (Sigma)	0,5 M
NH ₄ Cl (Sigma)	0,5 M
MgSO₄ (Sigma)	1 M

• Podłoże LB stałe

Podłoże LB (płynne) z dodatkiem 2% agaru (BioShop)

• Podłoże NB płynne (Nutrient broth)

Nutrient broth (Difco)	8 g/L
Glukoza (Sigma)	10 g/L
Tween 80 (BioShop)	0,2%

• Podłoże NB stałe

Podłoże NB (płynne) z dodatkiem 2% agaru (BioShop)

• Podłoże Middlebrook 7H9/OADC

Middlebrook 7H9 Broth (Difco)	4,7 g/L
Tween 80 (BioShop)	0,05%
Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	10%

Podłoże Middlebrook 7H10/OAD

Middlebrook 7H10 Agar (Difco)	19 g/L
Glicerol (BioShop)	0,5%
OAD	10%

• Podłoże Middlebrook 7H10/OADC

Middlebrook 7H10 Agar (Difco)	19 g/L
Glicerol (BioShop)	0,5%
Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	10%

3.10. Substancje dodawane do podłóż mikrobiologicznych

• Antybiotyki (Tabela 3.6.)

 Tabela 3.6.
 Katalog antybiotyków dodawanych do podłóż mikrobiologicznych.

Antybiotyk	E. coli	Mycobacterium
Ampicylina (BioShop)	100 µg/ml	-
Kanamycyna (BioShop)	50 μg/ml	25 μg/ml
Chloramfenikol (Sigma)	34 μg/ml	-
Anhydrotetracyklina (BioShop)	-	100 ng/ml

• Inne substancje

Sacharoza (BioShop)	2%
X-gal (BioShop)	40 µg/ml

3.11. Odczynniki

- Agar (BioShop)
- Akrylamid (BioShop)
- Albumina surowicy bydlęcej (BioShop)
- Alkohol izoamylowy
- APS (Sigma)
- Błękit bromofenolowy
- Bromek etydyny
- C₉H₁₂O₂ (wodoronadtlenek wodoru; Sigma)
- CaCl₂ (Sigma)
- CH₃COOH (POCH)
- CH₃COOK (Sigma)
- Chloroform
- Cytrynian sodu (Merck)
- Czerwień pirogalolu (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DNAza (Sigma)
- DTT (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Ekstrakt z drożdży (BioShop)
- Formamid
- Glicerol (BioShop)
- Glicyna (Sigma)
- Glukoza (Sigma)
- H₂O₂ (AVENA)
- HCl

- Imidazol (Sigma)
- IPTG (Sigma)
- KH₂PO₄ (Sigma)
- Kwas borowy (POCH)
- Kwas bursztynowy (Merck)
- Kwas oleinowy (POCH)
- Metanosulfonian metylu (Sigma)
- MgCl₂ (BioShop)
- MgSO₄ (Sigma)
- Mitomycyna C (Sigma)
- MnCl₂ (Sigma)
- Mocznik (BioShop)
- Molibdenian sodu (Sigma)
- Na₂HPO₄ (Sigma)
- Na₂S₂O₃ (Sigma)
- Na₂SO₄ (Sigma)
- NaCl (BioShop)
- NaH₂PO₄ (Sigma)
- NaMOPS (POCH)
- NaN₃ (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- NH₄Cl (Sigma)
- PBS (BioShop)
- PMSF (BioShop)
- RbCl (Sigma)
- RNAza (Sigma)
- Sacharoza (BioShop)
- SDS (BioShop)
- Szczawian sodu (Sigma)
- TEMED (Bio Rad)
- Tris HCl (BioShop)

- Triton X 100 (Sigma)
- Trypton (BioShop)
- Tween 20 (BioShop)
- Tween 80 (BioShop)
- β merkaptoetanol (Sigma)

3.12. Zestawy komercyjne

- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA
 Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)
- Zestaw do trawienia DNA w celu uzyskiwania preparatów RNA TURBO DNA-*free*[™] Kit (Ambion)
- Zestaw do elucji DNA z żelu agarozowego QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Zestaw do hybrydyzacji Southern blot ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (GE Healthcare)
- Zestaw do oceny integralności preparatów RNA Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies)
- Zestaw do oczyszczania RNA z rRNA Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina)
- Zestaw do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania KAPA Stranded RNA-seq Library Preparation Kit (KAPA Biosystems)
- Zestaw do pomiaru stężenia białka metodą Bradforda Bradford Reagent (Sigma)

- Zestaw do wywołania chemiluminescencji w metodzie western blot WESTAR SUN (Cyanagen)
- Zestaw do oczyszczania przeciwciał
 Pierce[™] Antibody Clean up Kit (Thermo Scientific[™])

3.13. Pozostałe odczynniki i materiały

- Barwnik do wybarwiania białek Instant blue[™] (Expedeon)
- Bibuła chromatograficzna Whatman (VWR)
- Butelki do hodowli prątków 25 cm² (Corning)
- Butelki do hodowli prątków 850 cm² (Greiner Bio-One)
- Filtry strzykawkowe o średnicy 0,22 µM i 0,45 µM (PALL)
- Kaseta rentgenowska
- Klisze rentgenowskie CL Xposure[™] (Thermo Scientific[™])
- Kolumna HiPrep[™] 16/60 Sephracyl[™] S 200 HR (Cytiva)
- Kolumna HiTrap Q FF (Ge Healthcare)
- Koncentratory Vivaspin[®] 15, 30 kDa MWCO (GE Healthcare)
- Kulki cyrkoniowe o średnicy 0,1 mm (BioSpec Products)
- Kuwety do elektroporacji 2 mm (Cell Projects)
- Membrana nitrocelulozowa Amersham[™] Hybond[™] (GE Healthcare)
- Membrana PVDF (Thermo Scientific[™])
- Mieszanina nukleotydów dNTP Mix (Thermo ScientificTM)
- Złoże HisPur[™] Ni-NTA (Thermo Scientific[™])

3.14. Aparatura

- Aparat do elektroporacji (Bio Rad)
- Aparat do elektroporacji (Lonza)

- Aparat do oceny integralności RNA Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- Homogenizator FastPrep 24MP (MP Biomedicals)
- Inkubator OmniLog (BIOLOG)
- Kołyska laboratoryjna (NeoLab)
- Łaźnia ultradźwiękowa
- Monolith NT.115 Micro Scale Thermophoresis (Nano Temper technologies)
- Sekwenator NextSeq 500 (Illumina)
- Skaner fluorescencyjny Typhoon 8600 (Molecular Dynamics)
- Sonikator ultradźwiękowy Vibra Cell 72408 (Bioblok Scientific)
- Spektrofotometr/Fluorymetr DS 11 FX (DeNovix)
- Stratalinker UV 1800 (StrataGene)
- System do oczyszczania białek AKTA Start (GE Healthcare)
- Termocykler Veriti[™] 96 dołkowy (Applied Biosystems)
- Termostat ThermoStat Plus (Eppendorf)
- Wirówka 5804 do probówek typu Falcon (Eppendorf)
- Wirówka IEC CL4OR (Thermo Scientific[™])
- Wirówka MiniSpin[®] Plus do probówek typu Eppendorf (Eppendorf)
- Wytrząsarka (Infors Orbitron)
- Wywoływarka do klisz rentgenowskich Medical X ray Processor (Kodak)

4. Metody

4.1. Hodowle bakteryjne

Hodowle *E. coli* prowadzono w płynnym lub zestalonym 2% agarem podłożu LB do 24 godz. w temperaturze 37°C (lub 20°C w przypadku szczepów *E. coli* Rosetta i *E. coli* BL21 po indukcji IPTG). Hodowle płynne inkubowane były w kolbach lub probówkach na wytrząsarce posuwisto - zwrotnej. Hodowle na podłożu stałym, inkubowane były w szalkach Petriego.

Hodowle szczepów *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* prowadzono w płynnym podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem 0,05% Tween oraz 0,1 objętości końcowej OADC przez 1 - 4 dni (dla *M. smegmatis*) i 7 - 14 dni (dla *M. tuberculosis*). Hodowle ww. szczepów prowadzono również na podłożu stałym Middlebrook 7H10 z dodatkiem 0,1 objętości końcowej OADC lub OAD lub AD (w zależności od warunków eksperymentu) do 3 dni (dla *M. smegmatis*) i 3 - 4 tyg. (dla *M. tuberculosis*).

W zależności od etapu badań, do podłóż dodawano antybiotyki lub inne substancje o charakterze nieantybiotycznym.

4.2. Techniki wykorzystane do pracy z DNA

4.2.1. Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA z komórek *E. coli* prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) zgodnie z zaleceniami producenta.

4.2.2. Izolacja chromosomalnego DNA

Chromosomalny DNA izolowano z wykorzystaniem metody mechanicznej dezintegracji komórek. Osad hodowli *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis* pobierano do 200 μ l buforu TE z kulkami cyrkoniowymi o średnicy 0,1 mm. Następnie komórki rozbijano mechanicznie z wykorzystaniem urządzenia FastPrep®-24 (MP Biomedicals) (2 razy po 45 sekund; 6 m/s) i lizowano za pomocą DNA-zolu. Do oczyszczania chromosomalnego DNA, do zawiesiny dodano 200 μ l mieszaniny chloroform : alkohol izoamylowy (24 : 1). Po odwirowaniu (10 min, 4° C, 13000 x g) DNA precypitowano trzema objętościami 96% etanolu z dodatkiem 0,1 objętości próbki 5 M octanu potasu. Preparaty DNA trawiono RNazą A (0,01 mg/ml) 0,5 godziny w temp. 37°C aby pozbyć się cząsteczek RNA.

4.2.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

Amplifikacja DNA z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy odbywała się z użyciem polimerazy DNA w buforze dedykowanym przez producenta, w objętości końcowej 50 μl. Reakcja rozpoczynała się od wstępnej denaturacji w temp. 95°C przez 5 min. Kolejny etap obejmował 35 powtarzających się cykli, z których każdy składał się z:

- Denaturacji (temp. 95°, 30 s)
- Przyłączania sekwencji oligonukleotydowych (temp. zależna od użytych sekwencji, 45 s)
- Wydłużania fragmentu DNA (temp. 68 lub 72°C w zależności od polimerazy, 60 s/1000 pz)

Końcowe wydłużanie fragmentu DNA (temp. 68 lub 72°C) trwała 15 min, następnie próbki chłodzono do 4°C.

4.2.4. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Trawienie DNA z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych odbywało się w buforze dedykowanym przez producenta, w objętości końcowej 50 μl przez 0,5 – 1 godz. w temp. 37°C.

4.2.5. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforezę poziomą w 1% żelu agarozowym (z dodatkiem 0,4% bromku etydyny) prowadzono w celu rozdziału różnej wielkości fragmentów DNA, ocenianych przez zastosowanie odpowiednich, komercyjnych standardów wielkości. Rozdział elektroforetyczny wykonywano w temp. pokojowej w buforze TAE (1 x), stosując napięcie prądu wynoszące 5 V/cm odległości pomiędzy elektrodami. Żele wizualizowano w świetle ultrafioletowym (UV) o długości fali 320 nm.

4.2.6. Elucja DNA z żelu agarozowego

Elucję DNA z żelu agarozowego prowadzono zgodnie z zaleceniem producenta z wykorzystaniem komercyjnego zestawy QIAGEN II Gel Extraction Kit (Qiagen).

4.2.7. Precypitacja DNA

Do precypitacji preparatów DNA używano trzech objętości zimnego EtOH (96%) oraz 0,1 objętości 5 M octanu potasu. Próbki inkubowano w temp. -80°C przez 0,5 godz., po czym wirowano je w temp. 4°C, przez 10 min. z prędkością 13000 x *g*. Osad przemywano 700 μ l EtOH (70%), suszono w temp. 55°C ok. 15 min i zawieszano w 12 μ l H₂O.

4.2.8. Łączenie fragmentów DNA

• Ligacja

Łączenie fragmentów DNA przeprowadzano z wykorzystaniem ligazy DNA T4 oraz komercyjnego buforu dedykowanego przez producenta. Reakcja odbywała się w objętości końcowej 20 μl, w temp. 16°C przez 24 godz.

• Annealing

Do łączenia komplementarnych sekwencji fragmentów DNA wykorzystywano bufor zawierający 20 mM Tris pH = 7,5 i 50 mM NaCl. Reakcje wykonano w temp. 95°C przez 2 min, a następnie jej cyklicznym spadku o 0,1°C/s do 25°C.

4.2.9. Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie fragmentów DNA wykonywano w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi przez dr M. Korycką – Machałę z wykorzystaniem metody Sangera na urządzeniu Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems).

4.2.10. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych

Pomiaru stężeń DNA i RNA (w wartościach ng/μl) dokonywano poprzez wykorzystanie spektrofotometru DS – 11 FX (DeNovix).

4.2.11. Transformacja komórek E. coli

• Przygotowanie komórek kompetentnych z wykorzystaniem chlorku rubidu

Komórki kompetentne *E. coli* przygotowywano z wykorzystaniem buforów zawierających chlorek rubidu (Rogers i Green, 2013). Przygotowane komórki porcjowano do schłodzonych probówek typu eppendorf, które przechowywano w temp. - 80°C.

Transformacja komórek metodą szoku termicznego

Do komórek kompetentnych dodawano plazmidowy DNA i inkubowano w łaźni lodowej przez 0,5 godz. Następnie komórki inkubowano w temp. 42°C przez 90 s, przenoszono do łaźni lodowej na 5 min, dodawano 500 μl płynnego podłoża LB i inkubowano w temp. 37°C przez 1 godz. Mieszaninę transformacyjną wysiewano na podłoże LB zestalone 2% agarem, z dodatkiem odpowiednich antybiotyków.

4.2.12. Transformacja komórek Mycobacterium

• Przygotowanie komórek kompetentnych *M. smegmatis*

Hodowlę *M. smegmatis* namnażano w 100 ml podłoża Middlebrook 7H9/Tween/OADC w temp. 37°C, na wytrząsarce posuwisto – zwrotnej, do uzyskania

wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6 - 0,8$. Następnie hodowle inkubowano w łaźni lodowej przez 1,5 godz., po czym wirowano w temp. 4°C przez 10 min z prędkością 5900 x g. Osad komórek zawieszano odpowiednio w 90 ml, 30 ml i 5 ml zimnego, 10% glicerolu. Ostatecznie komórki zawieszano w 1 ml 10% glicerolu, porcjowano po 100 µl do schłodzonych wcześniej probówek typu eppendorf i przechowywano w temp. - 80°C.

• Przygotowanie komórek kompetentnych M. tuberculosis

Hodowlę *M. tuberculosis* namnażano w 100 ml płynnego podłoża Middlebrook 7H9/Tween/OADC w temp. 37°C, do uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej $OD_{600} = 0,6 - 0,8$. Następnie do hodowli dodawano glicynę w końcowym stężeniu 1,5% i inkubowano w temp. 37°C przez 24 godz., po czym hodowle wirowano w temp. 37°C przez 10 min z prędkością 3900 x g. Osad zawieszano odpowiednio w 10 ml, 5 ml i 2 ml ciepłego, 10% glicerolu. Ostatecznie osad zawieszano w 1 ml 10% glicerolu, a otrzymane komórki porcjowano po 200 µl do probówek typu eppendorf, do których bezpośrednio dodawano plazmidowy DNA, który wprowadzano na drodze elektroporacji.

Transformacja komórek metodą elektroporacji

Do komórek kompetentnych *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis* dodawano plazmidowy DNA, przenoszono do kuwet o średnicy 2 mm (Cell Project) i poddawano elektroporacji z wykorzystaniem aparatu (Bio - Rad), przy pojemności elektrycznej 25 μ F, napięciu 2,5 kV i oporze 1000 Ω . Następnie zawartość kuwety przenoszono do 5 ml podłoża Middlebrook 7H9/Tween/OADC i inkubowano w temp. 37°C przez 24 godz. Po inkubacji, hodowle wysiewano na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC z dodatkiem odpowiednich czynników selekcyjnych i inkubowano w temp. 37°C przez 3 - 5 dni (*M. smegmatis*) lub do 3 - 4 tyg. (*M. tuberculosis*).

4.2.13. Konstrukcja plazmidów do rekombinacji homologicznej i selekcja mutantów delecyjnych *Mycobacterium*

Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej przebiegała wieloetapowo i obejmowała w początkowej fazie wklonowanie do wektora p2NIL fragmentów DNA

flankujących gen docelowy na końcu 5' i 3' (gen z wewnętrzną delecją) a także pochodzącej z wektora pGOAL17 kasety markerowej (zawierającej: *lacZ* – gen kodujący β-galaktozydazę, umożliwiający selekcję niebieskich kolonii w obecności X-gal; *sacB* - gen kodujący lewanosacharazę, warunkujący wrażliwość na sacharozę oraz *aph*, gen nadający oporność na kanamycynę). Obecność genów markerowych pozwoliła na selekcję mutantów typu SCO (*z ang*. Single crossover), zawierających zarówno natywną jak i zmutowaną kopię genów oraz mutantów typu DCO (*z ang*. Double crossover), zawierających natywną lub zmutowaną formę genu docelowego (Rycina 4.1.). Obecność zmutowanej kopii genów w szczepach *Mycobacterium* potwierdzano metodą PCR z wykorzystaniem sekwencji oligonukleotydowych komplementarnych do genu oraz metodą hybrydyzacji Southern blot z odpowiednio zaplanowanymi sondami genetycznymi.



Rycina 4.1. Schemat otrzymywania i selekcji mutantów *M. smegmatis* Δ*msmeg_1891, M. smegmatis* Δ*mpg* oraz *M. tuberculosis* Δ*rv3226c*.

4.2.14. Konstrukcja wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów DCO u *Mycobacterium*

Na pierwszym etapie konstrukcji wektorów integracyjnych służących do komplementacji mutantów typu DCO u *Mycobacterium* wykonano amplifikację fragmentów DNA, kodujących badane geny wraz z ich sekwencjami promotorowymi (*msmeg_1891* dla *M. smegmatis* i *rv3226c* dla *M. tuberculosis*), na matrycy chromosomalnego DNA odpowiednio *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Na dalszym etapie, fragmenty DNA, wklonowano do wektora pJET1.2 i poddano trawieniu z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych Xbal i HindIII oraz analizie sekwencyjnej, a następnie wklonowano do wektora integracyjnego pMV306Km, trawionego tymi samymi enzymami restrykcyjnymi (Rycina 4.2.).



Rycina 4.2. Schemat konstrukcji wektorów integracyjnych do komplementacji mutantów DCO u *Mycobacterium*. **A** – Amplifikacja genów: *msmeg_1891* lub *rv3226c* wraz z ich sekwencjami promotorowymi na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego z *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis*. **B** – Klonowanie ww. fragmentów DNA do wektora pJET1.2/blunt w miejsce MCS. **C** – Trawienie plazmidów pJET1.2 *-msmeg_1891* i pJET1.2 -

rv3226c oraz pMV306km enzymami restrykcyjnymi Xbal, HindIII. **D** - Klonowanie fragmentów DNA zawierających *msmeg_1891* lub *rv3226c* z ich sekwencjami promotorowymi do wektora pMV306km.

4.2.15. Konstrukcja plazmidu z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* u *M. smegmatis*

Na pierwszym etapie zaprojektowano sekwencje oligonukleotydowe, komplementarne do genu msmeg_1891 w odpowiedniej odległości od sekwencji PAM (z ang. Protospacer Adjacent Motif), które poddawano łączeniu (annealing) a następnie ligowano z wektorem pLJR962 (wektor dedykowany do obniżania poziomu ekspresji genów u M. smegmatis metodą CRISPRi/dCas9), trawionym restryktazą BsmBI. Mieszaninę ligacyjną transformowano komórki kompetentne E. coli Top 10. Z wybranych transformantów izolowano plazmidowy DNA, który w dalszym etapie poddawano analizie restrykcyjnej, z wykorzystaniem enzymu BsmBI, oraz analizie sekwencyjnej. Uzyskane w ten sposób rekombinowane plazmidy wprowadzono metodą elektroporacji do komórek kompetentnych M. smegmatis. Następnie dla potwierdzenia integracji wektora, z wybranych elektrotransformantów izolowano chromosomalny DNA, który wykorzystano jako matryce w reakcji amplifikacji, z zastosowaniem sekwencji starterowych, komplementarnych do fragmentu TetR/Cas9 plazmidu pLIR962 (Materiały, Tabela 3.2.). mutanty wykazywały zdolność do indukowanego Uzyskane w ten sposób anhydrotetracykliną, istotnego obniżenia poziomu ekspresji genu docelowego.



Rycina 4.3. Schemat konstrukcji plazmidu do obniżania poziomu ekspresji genu msmeg_1891. A – Klonowanie sekwencji PAM i sgRNA_{msmeg_1891} do wektora pLJR962 trawionego enzymem restrykcyjnym BsmBI. B – Indukcja anhydrotetracykliną.
C – Powstanie kompleksu dCas9 - PAM - sgRNA_{msmeg_1891}. D - Zahamowanie transkrypcji.

4.2.16. Konstrukcja wektora do poszukiwania białek partnerskich dla białka Msmeg_1891 i oczyszczanie kompleksów białkowych

W celu poszukiwania białek partnerskich dla białka Msmeg_1891, na pierwszym etapie pracy przystąpiono do konstrukcji modyfikowanego wektora pJAM2, który zawierał sekwencję FLAG, miejsce rozpoznawane przez proteazę TEV a także sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne BamHI i Xbal. Tak przygotowany wektor trawiono następnie ww. enzymami i klonowano w nim fragment DNA, kodujący gen *msmeg_1891*. Otrzymany w ten sposób wektor (pJAM-FLAG-TEV-*msmeg_1891*) wprowadzano następnie na drodze elektroporacji do komórek kompetentnych *M. smegmatis*. Aby potwierdzić obecność rekombinowanego plazmidu w komórkach *Mycobacterium* izolowano genomowy DNA z wybranych elektrotransformantów, którym transformowano komórki kompetentne *E. coli* Top 10. Na kolejnym etapie, z uzyskanych

transformantów *E. coli* izolowano plazmidowy DNA, który następnie został poddany analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem enzymów BamHI i Xbal oraz analizie sekwencyjnej. Po potwierdzeniu poprawności konstrukcji szczepu *M. smegmatis* pJAM2 – FLAG – TEV – *msmeg_1891*, przystąpiono do jego hodowli w podłożu Middlebrook 7H9/Tween/OADC, z dodatkiem acetamidu (0,2%), co umożliwiło indukcję ekspresji genu *msmeg_1891*, którą potwierdzono z wykorzystaniem techniki western blot i przeciwciał anty – Msmeg_1891.

Do oczyszczenia kompleksów białkowych stosowano chromatografię powinowactwa przepuszczając lizaty komórkowe uzyskane po indukcji acetamidem przez złoże opłaszczone przeciwciałami anty–FLAG o stężeniu wynoszącym 1,5 mg/ml (Materiały, 3.7.6.). Związane ze złożem kompleksy wytrącano wykorzystując bufor zawierający czerwień pirogalolu (0,05 mM) a następnie wirowano (3900 x g w temp. 4°C) i suszono w celu otrzymania osadu.

4.2.17. Hybrydyzacja techniką Southern blot

Genotyp mutantów SCO jak i DCO potwierdzano metodą Southern blot. W tym celu wykonano transfer trawionego DNA z 1% żelu agarozowego na nylonową membranę zgodnie z protokołem opisanym przez Sambrook i wsp. w 1989 r. Etapy znakowania sondy, prehybrydyzacji, hybrydyzacji oraz detekcji sygnału przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując zestaw odczynników ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Biosciences).

4.3. Techniki wykorzystane do pracy z RNA

4.3.1. Izolacja RNA z komórek Mycobacterium

Osad komórek *Mycobacterium* zawieszano w H₂O DEPC (300 μl) i przenoszono do probówek typu eppendorf. Do próbek dodawano TRIzol (900 μl), zawiesinę przenoszono do komercyjnych probówek Lysing Matrix (z 0,1 mm kulkami krzemionkowymi) i dwukrotnie homogenizowano przez 45 s (6 m/s) na urządzeniu FastPrep – MP24 z 5 - minutową inkubacją w łaźni lodowej pomiędzy cyklami. Po opadnięciu kulek na dno probówek, zebrano znad nich klarowną ciecz, którą przeniesiono do probówek typu

eppendorf i wirowano w temp. 4°C przez 10 min z prędkością 12000 x g. Supernatant przeniesiono do nowych probówek eppendorf i inkubowano w temp. pokojowej przez 6 min. Na kolejnym etapie do próbek dodawano chloroform (250 μl) i mieszano przez 2 min. Dalej próbki inkubowano w łaźni lodowej przez 10 min, a następnie wirowano w temp. 4°C przez 15 min z prędkością 12000 x g, supernatant (ok. 2/3 objętości) przenoszono do nowych probówek i precypitowano 1 objętością izopropanolu, z dodatkiem 1/10 objętości 3 M octanu sodu o pH 5,7 oraz 1 µl GlycoBlue (Invitrogen), w temp. - 80°C przez 24 godz. Próbki następnie wirowano w temp. 4°C przez 30 min z prędkością 20000 x q, supernatant usuwano, a osad płukano zimnym 70% EtOH (500 μ l) i ponownie wirowano w takich samych warunkach. Osad suszono w temp. pokojowej do momentu odparowania resztek alkoholu, po czym zawieszano w 40 µl H₂O. Stężenie RNA mierzono na spektrofotometrze DS – 11 FX (DeNovix). Uzyskane próbki RNA trawiono DNAzą z wykorzystaniem komercyjnego zestawu TURBO DNA-*free*TM Kit (Ambion). Następnie, stosując komercyjny zestaw Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies), oceniano integralność otrzymanych preparatów RNA na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta zestawu.

4.3.2. Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania

W celu przygotowania bibliotek do sekwencjonowania, na pierwszym etapie, uzyskany RNA (Metody, 4.3.1.) o wartości współczynnika integralności powyżej 7, oczyszczano z rRNA, stosując komercyjny zestaw Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Materiały, 3.12.), wg zaleceń producenta. Na dalszym etapie wykorzystano komercyjny zestaw KAPA Stranded RNA-seq Library Kit (Materiały, 3.12.), zgodnie z zaleceniami producenta, w wieloetapowej procedurze obejmującej uzyskanie fragmentów RNA o odpowiedniej wielkości, syntezę cDNA, adenylację końców DNA i łączenie z adapterami zawierającymi 6nukleotydowe sekwencje indeksujące. Biblioteki następnie amplifikowano, a jakość otrzymanych bibliotek DNA analizowano na urządzeniu Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Agilent DNA 1000 Kit (Agilent Technologies) wg zaleceń producenta. Sekwencjonowanie bibliotek RNA Seq przeprowadzano we współpracy z pracownią Biobank, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Analizę ilościową bibliotek w oparciu o PCR w czasie rzeczywistym oraz sekwencjonowanie wykonywał mgr Marcin Słomka, zatrudniony
w pracowni Biobank. Sekwencjonowanie było prowadzone w technologii Illumina, na urządzeniu NextSeq550, przy użyciu zestawu do sekwencjonowania 2x75bp, v.2 o przeciętnej wydajności (*z ang*. midoutput).

4.3.3. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (qRT - PCR)

• Synteza cDNA – reakcja odwrotnej transkrypcji na matrycy RNA

Reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzana była z wykorzystaniem zestawu SuperScript III First – Strand Synthesis Super Mix Kit (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta.

Analiza ilości produktu w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy DNA

Ekspresja genów oparta na qRT – PCR analizowana była w aparacie Quant Studio 5 (Applied Biosystems) z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Mieszanina reakcyjna zawierała:

- cDNA (50 ng)
- Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (1 x)
- sekwencje oligonukleotydowe (0,3 μM + 0,3 μM)
- ddd H₂O do 25 μl

Reakcję prowadzono początkowo w temp. 95°C przez 10 min (początkowa aktywacja), a następnie przez 40 powtarzających się cykli w następujących warunkach:

- 95°C; 15 s (denaturacja)
- 62°C; 30 s (przyłączanie sekwencji oligonukleotydowych)
- 72°C; 30 s (wydłużanie)

W celu oceny jednorodności powstałych produktów PCR, po zakończonej reakcji wyznaczano krzywą topnienia, a poziomy ekspresji badanych transkryptów analizowano w odniesieniu do genu referencyjnego *sigA* (kodującego podjednostkę polimerazy RNA mykobakterii), ulegającego konstytutywnej ekspresji w komórkach prątków. RNA

wykorzystany jako matryca do otrzymania cDNA izolowano w trzech powtórzeniach, z trzech niezależnych od siebie hodowli *Mycobacterium*.

Analiza wyników metodą komparatywną

Różnica w poziomie ekspresji genów pomiędzy badanymi szczepami oceniana była z wykorzystaniem metody komparatywnej (Livak i Schmittgen, 2001), na podstawie której wyniki otrzymanego transkryptu analizowane były w odniesieniu do poziomu ekspresji genu referencyjnego *sigA* (czynnik σ^{70}). Początkowo wyznaczano cykle progowe C_t (*z ang.* Copy treshold) amplifikacji genów kontrolnych oraz badanych w szczepach *Mycobacterium*. Na kolejnym etapie wyznaczono różnicę pomiędzy wartościami progowymi (C_t) genu kontrolnego i badanego (ΔC_t), korzystając ze wzoru:

 ΔC_t (szczep kontrolny) = C_t (genu badanego) - C_t (genu kontrolnego)

ΔC_t (szczep badany) = C_t (genu badanego) - C_t (genu kontrolnego)

a następnie obliczając wartość podwójnej delty ($\Delta\Delta C_t$):

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (szczep badany) - ΔC_t (szczep kontrolny)

Poziom ekspresji genu badanego względem genu kontrolnego wyznaczany był na podstawie wartości współczynnika R, korzystając ze wzoru: $\mathbf{R} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, gdzie przy R = 1 wykazywano brak różnicy w poziomach ekspresji genów, przy R < 1 oznaczano obniżony poziom ekspresji genu w szczepie badanym względem szczepu kontrolnego i R > 1 gdy poziom ekspresji genu badanego był wyższy niż w przypadku szczepu kontrolnego.

4.4. Techniki wykorzystane do pracy z białkami

4.4.1. Konstrukcja wektorów do nadprodukcji białka Msmeg_1891

W celu otrzymania rekombinowanych plazmidów do nadprodukcji białka Msmeg_1891, na pierwszym etapie zaprojektowane zostały oligonukleotydowe sekwencje starterowe, umożliwiające amplifikację fragmentu DNA kodującego *msmeg_1891* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis*: w fuzji N - lub C – końca ze znacznikiem

histydynowym (6 x HIS - tag) wektora pET-28a. Produkty amplifikacji klonowano do wektora pJET1.2/blunt, otrzymując odpowiednio: wektor pFG3 (fuzja N – końca genu) oraz wektor pFG4 (fuzja C – końca genu), którymi transformowano komórki kompetentne *E. coli* Top 10. Z wybranych transformantów izolowano plazmidowy DNA, który następnie poddawano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem enzymów dla fuzji N – końca (Ndel i Xhol) i C – końca (Xbal i Xhol). Tak przygotowane fragmenty DNA łączono z wektorami pET-28a trawionymi ww. enzymami i otrzymano plazmidy do nadprodukcji Msmeg_1891, odpowiednio: pFG5 (fuzja N – końca ze znacznikiem polihistydynowym) oraz pFG6 (fuzja C – końca ze znacznikiem polihistydynowym) (Rycina 4.3.).



Rycina 4.4. Schemat konstrukcji wektorów do oczyszczanie rekombinowanego białka Msmeg_1891 w fuzji N – i C – końca ze znacznikiem polihistydynowym 6 x HIS – tag. A – Amplifikacja genu *msmeg_1891* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* w fuzji N – lub C – końca ze znacznikiem polihistydynowym (6 x HIS - tag). B - Klonowanie *msmeg_1891* do wektora pJET1.2/blunt. C – Trawienie wektora pFG4 enzymami restrykcyjnymi Xbal, Xhol; klonowanie *msmeg_1891* w fuzji N – końca ze znacznikiem polihistydynowym do wektora pET-28a. **D** – Trawienie wektora pFG3 enzymami restrykcyjnymi NdeI, XhoI; klonowanie *msmeg_1891* w fuzji C – końca ze znacznikiem polihistydynowym do wektora pET-28a.

4.4.2. Elektroforeza pionowa w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS – PAGE)

Elektroforezę pionową w żelu poliakrylamidowym (w warunkach denaturujących) prowadzono w celu rozdziału preparatów białkowych, których wielkość oceniano przez zastosowanie komercyjnych, białkowych standardów wielkości. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w temp. pokojowej w buforze 1 x TGB przy napięciu prądu 100 – 140 V. W celu wizualizacji białek, żele barwiono przez 0,5 godz. z wykorzystaniem barwnika Instant blue (Expedeon), zawierającego koloidalny błękit Coomassie.

4.4.3. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka Msmeg_1891 w heterologicznych układach *E. coli* BL21 i *E. coli* Rosetta

• Nadprodukcja białka Msmeg_1891

Na pierwszym etapie pracy, wektory pFG5 i pFG6 (niosące odpowiednio: gen *msmeg_1891* w fuzji ze znacznikiem histydynowym 6 x HIS – tag przy N – końcu oraz C- końcu) użyto do transformacji komórek kompetentnych *E. coli* BL21 i *E. coli* Rosetta. Następnie wybrano po 1 kolonii bakterii dla układu *E. coli* BL21 oraz *E. coli* Rosetta zawierających wektor pFG6 (fuzja genu *msmeg_1891* ze znacznikiem polihistydynowym 6 x HIS – tag przy C - końcu), które następnie namnażano w płynnym podłożu LB (5 ml) z dodatkiem 50 µg/ml kanamycyny oraz – w przypadku *E. coli* Rosetta – dodatkowo chloramfenikolu w stężeniu 34 µg/ml. Hodowle inkubowano w temp. 37°C przez 24 godz. (na wytrząsarce). Na kolejnym etapie pracy, 5 ml całonocnej hodowli (inokulum), wykorzystano do zaszczepienia 500 ml płynnego podłoża LB z dodatkiem ww. antybiotyków i inkubowano w temp. 37 °C do gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8. W kolejnym kroku do hodowli dodawano izopropylo– β –D–tiogalaktopirazonyd (IPTG) w stężeniu końcowym 1 mM (dla *E. coli* Rosetta) lub 0,4 mM (dla *E. coli* BL21) i *E. coli*

Rosseta bez dodatku IPTG. Następnie hodowle wirowano w temp. 4°C przez 20 min z prędkością 3900 x g. Otrzymany osad przechowywano w temp. -80°C.

Oczyszczanie białka Msmeg_1891 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym (6 x HIS) metodą metalopowinowactwa na złożu niklowym.

Osady komórek E. coli BL21 i E. coli Rosetta z zaindukowanym przez IPTG białkiem Msmeg 1891 w fuzji ze znacznikiem histydynowym 6 x HIS rozmrażano w łaźni lodowej przez 30 min i zawieszano w buforze A (10 ml; Materiały 3.6.3.1.) zawierającym: lizozym (0,1 mg/ml; Sigma), PMSF (0,001 M; BioShop), koktajl inhibitorów proteaz (0,01 mg/ml; Thermo Scientific[™]), RNAze A (0,01 mg/ml; Sigma), DENARASE (1 U; VWR) i inkubowano w łaźni lodowej przez 15 min. Następnie przystępowano do dezintegracji komórek (w łaźni lodowej) z wykorzystaniem sonikatora ultradźwiękowego Vibra Cell 72408 (Bioblok Scientific), zaprogramowanym na ustawienia 10 cykli: 9,9 s sonikacji/9,9 s przerwy przy amplitudzie wynoszącej 30%. Na kolejnym etapie, zawiesinę komórek bakteryjnych wirowano w temp. 4°C przez 1 godz. z prędkością 16000 x g. Supernatant filtrowano przez strzykawkę z filtrem o średnicy porów 0,45 μM, po czym przenoszono go na skalibrowaną kolumnę ze złożem niklowym (HisPur[™] Ni-NTA (Thermo Scientific[™]). W kolejnym kroku złoże ze związanym białkiem przemywano 100 ml buforu A, następnie eluowano 10 ml buforu B (Materiały 3.6.3.1.) i kolekcjonowano frakcje białkowe (po 1 ml). Poszczególne frakcje preparatów białkowych rozdzielano w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) w obecności białkowego standardu wielkości (Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder). Rozdział elektroforetyczny preparatów białkowych wykonywano w buforze TGB (1 x), pod napięciem 100 - 140 V. Następnie żel barwiono w Instant blue (Expedeon) przez 20 min, odpłukiwano H₂O i analizowano skuteczność i efektywność oczyszczania białek w odniesieniu do użytego standardu wielkości.

Oczyszczanie białka Msmeg_1891 w systemie wysokosprawnej chromatografii cieczowej AKTA Start

W celu pozbycia się zanieczyszczeń innymi białkami w preparatach białkowych, wstępnie oczyszczonych na złożu do chromatografii metalopowinowactwa, białko Msmeg_1891 dodatkowo oczyszczono w systemie wysokosprawnej chromatografii cieczowej AKTA Start. W tym celu sekwencyjnie wykorzystano następujące kolumny:

Kolumna jonowymienna HiTrap Q FF (5 ml)

Frakcje preparatów białkowych oczyszczone na złożu niklowym łączono ze sobą i rozcieńczano w buforze A (50 mM Tris – HCl, 50 mM NaCl, 10% glicerol) do osiągnięcia końcowej wartości NaCl wynoszącej 50 mM. Tak przygotowany roztwór białka w objętości 5 ml nanoszono na kolumnę HiTrap Q FF (Cytiva), umieszczoną i zainstalowaną w systemie wysokosprawnej chromatografii cieczowej AKTA Start, zgodnie z zaleceniami producenta. Elucję białka przeprowadzano we wzrastającym stężeniu NaCl (50 mM – 1 M). Frakcje preparatów białkowych były zbierane automatycznie (po 3 ml) i analizowane w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).

Kolumna do filtracji żelowej GF03

Na kolejnym etapie preparaty białkowe uzyskane w wyniku oczyszczania Msmeg_1891 na kolumnie jonowymiennej zagęszczano z użyciem koncentratorów Vivaspin® 15 kDa MWCO, poprzez wirowanie w temp. 4°C przez 20 min z prędkością 3900 x *g* do uzyskania objętości preparatu nie przekraczającej 1 ml. Tak przygotowane białko nanoszono na kolumnę do filtracji żelowej GF03 (Cytiva). W celu kalibracji kolumny sporządzono odgazowany bufor A (50 mM Tris – HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerol), którym płukano system AKTA poprzez ustawienie automatycznego cyklu wymywania pozostałości etanolu. Po skalibrowaniu kolumny do filtracji żelowej, nanoszono na nią ok. 800 µl skoncentrowanego białka Msmeg_1891 i zbierano poszczególne frakcje. Następnie kolumnę przemywano odgazowaną H₂O i 20% EtOH. Uzyskane preparaty białka Msmeg_1891 ponownie koncentrowano, a ich czystość analizowano w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS – PAGE).

• Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano z wykorzystaniem odczynnika Bradford (Sigma). Do kuwety o średnicy 10 mm dodawano 1 ml ww. odczynnika, a następnie dodawano do niej 10 μl oczyszczonego i skoncentrowanego białka, dokładnie mieszano i inkubowano w temp. pokojowej przez 20 min. Po tym czasie stężenie badanego białka określano z użyciem spektrofotometru DS – 11 FX (DeNovix), odnosząc się do krzywej standardowej wykreślonej na podstawie wzorców BSA. Próbę kontrolną podczas pomiarów stężeń stanowił odczynnik Bradford. Stężenie badanego białka podawano w wartości mg/ml.

• Otrzymywanie poliwalentnej surowicy anty – Msmeg_1891

Poliwalentna surowica odpornościowa anty – Msmeg_1891 uzyskana została w ramach współpracy z Katedrą Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego poprzez immunizację królika białkiem Msmeg_1891 w stężeniu 1 mg/ml.

• Oczyszczanie przeciwciał anty – Msmeg_1891

W celu doczyszczenia przeciwciał anty – Msmeg_1891, na pierwszym etapie przeprowadzano rozdział elektroforetyczny oczyszczonego preparatu białka Msmeg_1891 w końcowym stężeniu 0,5 mg/ml, w 12% żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) w obecności białkowego standardu wielkości (Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder). Na kolejnym etapie wykonano transfer badanego białka na membranę PVDF. Fragment membrany zawierający białko Msmeg_1891 (32 kDa) wycinano i inkubowano z poliwalentną surowicą anty – Msmeg_1891 w temp. 4°C przez 1,5 godz. Po tym czasie, wykorzystując komercyjnie dostępny zestaw Pierce[™] Antibody Clean – Up kit (ThermoFisher), przeprowadzono odzyskiwanie związanych z membraną przeciwciał, postępując zgodnie z zaleceniami producenta.

4.4.4. Test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym EMSA (*z ang.* Electrophoretic Mobility Shift Assay) - badanie oddziaływania białko - DNA/RNA

Analizę oddziaływań białko – DNA/RNA wykonywana metodą EMSA, polegającą na rozdziale elektroforetycznym kompleksów białko – DNA w 4% żelu poliakrylamidowym. Reakcje białko - DNA przygotowywano w 1 x buforze (20% glicerol, 2,5 M EDTA, 250 mM NaCl, 50 mM Tris – HCl). Zoptymalizowano eksperymentalnie dobór stężeń substratów DNA (lub RNA) znakowanych heksachlorofluoresceiną (HEX) i cyjaniną 5 (Cy5) (12 nM), oraz białka Msmeg_1891 (0,1 μ M – 1 μ M), a reakcje inkubowano w temp. 37°C od 30 min do 2 godz., po czym przeprowadzano rozdział elektroforetyczny kompleksów substrat - białko w 4% żelu poliakrylamidowym, w buforze TBE (Materiały 3.6.1.) w łaźni lodowej przez 1 godz. przy napięciu prądu wynoszącym 70 V. Następnie żel wizualizowano w aparacie Typhoon 8600 (Molecular Dynamics).

4.4.5. Termoforeza mikroskalarna - badanie siły oddziaływania białka – substraty DNA/RNA

Termoforezę w mikroskali przeprowadzono z wykorzystaniem białka Msmeg_1891 oraz substratów DNA znakowanych cyjaniną 5 (Cy5) na urządzeniu Monolith NT.115 MicroScale Thermophoresis (Nano Temper technologies). W tym celu przygotowano reakcje substratów o stałym stężeniu 15 nM, ze wzrastającym stężeniem białka Msmeg_1891 (stężenia od 0,00179 do 7,31 μM). Próbki umieszczano w kapilarach (w badaniach użyto komercyjnego zestawu kapilar Monolith Premium Capillaries), po czym - zgodnie z zaleceniami producenta – umieszczano w urządzeniu Monolith NT.115 i analizowano z wykorzystaniem oprogramowania firmy Nano Temper.

4.4.6. Rozdział elektroforetyczny w żelach denaturujących z mocznikiem - test na aktywność białka Msmeg_1891 metodą UREA - PAGE

W celu zbadania aktywności enzymatycznej Msmeg_1891 przygotowywano jego reakcje z wyznakowanymi heksachlorofluoresceiną (HEX) i cyjaniną 5 (Cy5) substratami DNA (Tabela 3.3.), wykorzystując bufor zawierający 20 mM Tris – HCl, 1 mM DTT,

1 mM EDTA, uzupełniając reakcję H₂O do końcowej objętości 20 μl. Do ww. reakcji dodawano (w zależności od przeprowadzanego eksperymentu) jony dwuwartościowe (Co²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺) lub jednowartościowe (Na⁺, K⁺) i inkubowano w zakresie temperatury 30 - 44°C w czasie 0,5 – 2 godz. Następnie do próbek reakcji dodawano równą objętość buforu do obciążania w denaturujących żelach poliakrylamidowych (Materiały 3.6.2.). Dalej próbki denaturowano inkubując je w temp. 98°C przez 10 min. Po tym czasie, próbki niezwłocznie nanoszono na poliakrylamidowy żel z 7 M mocznikiem (który zapewniał warunki denaturujące, pozwalające na uzyskanie rozdzielczości na poziomie pojedynczych nukleotydów) i przeprowadzano elektroforezę w temp. 45 - 55°C, pod napięciem 850 V do momentu osiągnięcia rozdziału w 2/3 długości żelu. Na kolejnym etapie żel wizualizowano w aparacie Typhoon 8600 (Molecular Dynamics).

4.4.7. Otrzymywanie lizatów białkowych z Mycobacterium

W celu przygotowania lizatów białkowych z komórek *Mycobacterium*, namnażano biomasę w 10 ml podłoża Middlebrook 7H9/Tween/OADC, którą wirowano w temp. 4°C przez 10 min, z prędkością 13000 x g. Osady zawieszano w buforze 1 x TE (200 µl) zawierającym 2% SDS i inkubowano w temp. 55°C przez 15 min, dodawano kulki cyrkoniowe (po 30 µl), o średnicy 0,1 mm i rozbijano na urządzeniu FastPrep - 24MP (5 x 20 s, z prędkością 6 m/s). Następnie próbki wirowano w temp. 4°C przez 15 min, z prędkością 13000 x g. Supernatant (zawierający ekstrakt z białkami) przenoszono do nowej probówki typu eppendorf.

4.4.8. Immunodetekcja z zastosowaniem techniki western blot

Immunodetekcja z zastosowaniem techniki western blot na pierwszym etapie wymagała przeprowadzenia procesu elektroforezy preparatów białkowych w 12% poliakrylamidowym żelu w warunkach denaturujących z użyciem SDS (SDS - PAGE). Następnie, przeprowadzono transfer białek na membranę PVDF w buforze do transferu (Materiały 3.6.4.), przy natężeniu prądu 50 mA, w temp. 4°C przez 24 godz. Dalej membranę inkubowano w temp. pokojowej przez 1,5 godz. w buforze blokującym (Materiały 3.6.4.). Po tym czasie, membranę inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi, skierowanymi przeciwko Msmeg_1891 w temp. pokojowej przez 1,5 godz. Później, membranę płukano

w buforze TBS – T (Materiały 3.6.4.) (6 x 5 min) w celu pozbycia się niezwiązanych przeciwciał pierwszorzędowych. Na kolejnym etapie dodawano przeciwciała drugorzędowe i ponownie inkubowano w temp. pokojowej przez 1,5 godz., po czym powtórzono płukanie w ww. warunkach w buforze TBS – T. Tak przygotowaną membranę inkubowano z substratem dla peroksydazy (inkubacja w temp. pokojowej przez 2 min), po czym umieszczano ją w kasecie rentgenowskiej. Po ekspozycji w temp. pokojowej (1 min) kliszę RTG wywoływano za pomocą automatycznego systemu Medical X – ray Processor.

4.5. Techniki wykorzystane w analizach fenotypowych

4.5.1. Ocena wrażliwości szczepów mykobakterii po ekspozycji hodowli na działanie czynników genotoksycznych z zastosowaniem testu punktowego wysiewu hodowli bakteryjnej potraktowanej czynnikiem uszkadzającym po wykonaniu szeregu rozcieńczeń hodowli

Szczepy *Mycobacterium* hodowano w płynnym podłożu Middlebrook 7H9/Tween/OADC do osiągnięcia wartości współczynnika gęstości optycznej OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8 (logarytmiczna faza wzrostu) lub OD₆₀₀ > 2,5 (stacjonarna faza wzrostu), z dodatkiem odpowiednich antybiotyków w zależności od prowadzonego eksperymentu. Następnie przygotowano 1 ml hodowli o OD₆₀₀ = 0,1 w PBST. Do hodowli dodawano – w zależności od wykonywanego eksperymentu - czynniki genotoksyczne (20 mM H₂O₂, 0,4% MMS, 200 ng/ml MMC, 10 mM CHP) i inkubowano w temp. pokojowej 0,5 – 2 godz. Na kolejnym etapie przygotowywano szeregi rozcieńczeń hodowli w zakresie 10⁻¹ - 10⁻⁵, nanosząc po 5 µl z każdego rozcieńczenia na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC i inkubowano w temp. 37°C przez 3 – 5 dni (dla *M. smegmatis*) lub do 3 tyg. (dla *M. tuberculosis*). Następnie hodowle porównywano z kontrolą, którą stanowiły szczepy niepoddane ekspozycji na działanie czynników genotoksycznych. W przypadku zastosowanych dawek promieniowania ultrafioletowego, przygotowane płytki z hodowlami przenoszono do aparatu Stratalinker UV 1800 (StrataGene) i naświetlano w ciemności dawkami (5, 10, 20 mJ/cm²).

4.5.2. Ocena wrażliwości szczepów mykobakterii po ekspozycji hodowli na działanie czynników genotoksycznych metodą określania liczby żywych komórek (CFU)

Hodowle prowadzono tak jak w punkcie 4.5.1. do momentu inkubacji z wybranymi czynnikami genotoksycznymi. Na kolejnym etapie przygotowywano szeregi rozcieńczeń (w zakresie $10^{-1} - 10^{-5}$) dla każdego ze szczepów, wysiewano po 100 µl hodowli na podłoże stałe Middlebrook 7H10/OADC i inkubowano w temp. 37°C przez 3 – 5 dni (dla *M. smegmatis*) lub do 3 tyg. (dla *M. tuberculosis*). Następnie zliczano kolonie wyrosłe z wysiewu poszczególnych rozcieńczeń mieszaniny bakterii i porównywano z liczbą kolonii otrzymanych dla szczepów kontrolnych, którą stanowiły szczepy niepoddane ekspozycji na działanie czynników genotoksycznych. Oceniano procent przeżywalności szczepów pod wpływem działania badanych czynników.

5. Wyniki

Prątki z rodzaju *Mycobacterium* nieustannie narażone są na działanie czynników genotoksycznych, dlatego też w ich komórkach niezbędna jest obecność białek uczestniczących w naprawach uszkodzeń DNA. Jednym z niedawno zidentyfikowanych białek, o słabo scharakteryzowanej funkcji u bakterii, jest Msmeg_1891, należące do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (*z ang.* SOS Resposne Associated Peptidases).

W publikacji Płociński i in., 2017, wykorzystujących spektrometrię mas wykazano, że białko to jest zdolne do wiązania się z substratami przypominającymi pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA. Kolejne badania, zmierzające do określenia molekularnej charakterystyki kompleksu degradosomu RNA u mykobakterii, z zastosowaniem metody sieciowania wiązań RNA – białko, wykazały że białko Rv3226c, będące homologiem Msmeg_1891, było jednym z najsilniej oddziałujących białek z RNA (Płociński i in., 2019).

Na podstawie powyższych badań wstępnych, w niniejszej pracy doktorskiej dokonano szczegółowej analizy mykobakteryjnych białek SRAP, weryfikując ich domniemany udział w procesach naprawy uszkodzeń DNA u prątków.

5.1. Konstrukcja mutantów delecyjnych *M. smegmatis i M. tuberculosis* oraz mutanta z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891.*

W celu identyfikacji funkcji Msmeg_1891 i jego homologu u *M. tuberculosis* -Rv3226c, na pierwszym etapie badań postanowiono skonstruować szczep *M. smegmatis* z delecją *msmeg_1891* oraz *M. tuberculosis* z delecją *rv3226c.* Na pierwszym etapie skonstruowano samobójcze plazmidy pMS1 i pMT1, zgodnie z opisem zawartym w rozdziale Metody 4.2.13., a następnie wprowadzono je do komórek szczepów odpowiednio *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, po czym poszukiwano mutantów otrzymanych na drodze wymiany alleli (rekombinacja homologiczna) charakteryzujących się obecnością wyłącznie zmutowanej kopii genu *msmeg_1891* i *rv3226c* (Metody 4.2.13.). W celu weryfikacji otrzymanych mutantów wyizolowano chromosomalny DNA, który użyto

jako matrycę w łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z wykorzystaniem odpowiednich starterów oligonukleotydowych (Tabela 3.2.). Otrzymane w produkty amplifikacji rozdzielano w 1% żelu agarozowym, uzyskując ostatecznie produkty o wielkości 455 pz, w przypadku mutanta Δ*msmeg_1891,* oraz 439 pz dla mutanta Δ*rv3226c.* Dodatkowo, genotyp uzyskanych mutantów potwierdzono z zastosowaniem hybrydyzacji Southern blot z odpowiednio zaprojektowanymi sondami genetycznymi dla *M. smegmatis* (Rycina 5.1.) lub *M. tuberculosis* (Rycina 5.2.), trawiąc wcześniej chromosomalny DNA (wyizolowany z mutantów i szczepów kontrolnych) enzymem restrykcyjnym Smal (dla *M. smegmatis*) i PstI i EcoRV (dla *M. tuberculosis*). W wyniku trawienia otrzymano produkty 2867 pz (natywna forma genu) i 2533 pz (zmutowana kopia genu) dla *M. tuberculosis*.

Następnie przystąpiono do konstrukcji ukierunkowanych mutantów M. smegmatis z delecjami w obrębie genów kodujących zarówno badane w pracy białko Msmeg 1891 oraz dodatkowo z delecjami w genach kodujących białka, uczestniczące w różnych ścieżkach naprawy uszkodzeń DNA u prątków, np. poprzez wycinanie zasady azotowej – BER - ($\Delta endolV$, Δmpg) czy poprzez łączenie niehomologicznych końców DNA - NHEJ - (Δku , $\Delta liqD$). W tym celu przygotowano komórki kompetentne z dostępnych w laboratorium szczepów mutantów M. smegmatis Δ ligD, M. smegmatis Δ ku, M. smegmatis Δ (ku, ligD, *ligC1C2*, *prm2*), *M. smegmatis* Δ(*ligC1C2*, *prm2*), do których wprowadzono plazmid pMS1 z delecją w genie msmeg 1891 oraz komórki kompetentne z mutantów M. smegmatis mc², M. smegmatis $\Delta msmeg_1891$ i M. smegmatis Δ (endolV, msmeg_1891), do których wprowadzono plazmid pMPG1 z delecją w genie mpg. Genotyp mutantów wielokrotnych, potwierdzono zarówno z wykorzystaniem techniki PCR i sekwencji oligonukleotydowych jak i hybrydyzacją Southern blot. W tym celu chromosomalny DNA izolowany ze szczepów z delecją w obrębie msmeg_1891 trawiono enzymem restrykcyjnym Smal, otrzymując produkty 2867 pz (natywna forma genu) i 2533 pz (zmutowana kopia genu) (Rycina 5.3.); oraz z delecją w mpg enzymem restrykcyjnym BamHI, otrzymując produkty 1070 pz (natywna forma genu) i 828 pz (zmutowana kopia genu) (Rycina 5.4., 5.5.).



Rycina 5.1. Potwierdzenie genotypu mutanta *M. smegmatis* z delecją w obrębie genu *msmeg_1891*. Na rycinie przedstawiono schemat trawienia enzymem restrykcyjnym Smal chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów oraz wyniki analizy Southern blot: **1** – szczep typu dzikiego; **2-4**, **6** – mutanty DCO; **5** - SCO.



Rycina 5.2. Potwierdzenie genotypu mutanta *M. tuberculosis* z delecją w obrębie genu *rv3226c*. Na rycinie przedstawiono schemat trawienia enzymami restrykcyjnymi PstI i EcoRV chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów oraz wyniki analizy Southern blot: **1** – szczep typu dzikiego; **2**, **3** – SCO; **4** – mutant DCO.



Rycina 5.3. Potwierdzenie genotypu wielokrotnych mutantów *M. smegmatis* z delecją w obrębie genów *ligD, ku, ligC1C2, prm2* oraz genu *msmeg_1891*. Na rycinie przedstawiono schemat trawienia enzymem restrykcyjnym Smal chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów oraz wyniki analizy Southern blot: **1** – szczep typu dzikiego; **2** – Δ *ligD,* (*msmeg_1891* SCO); **3** – Δ (*ligD, msmeg_1891*) (DCO), **4** – Δ *ku,* (*msmeg_1891* SCO); **5** – Δ (*ku, msmeg_1891*) (DCO), **6** – Δ (*ku, ligD, ligC1C2, prm2*) (*msmeg_1891*SCO); **7, 8** - Δ (*ku, ligD, ligC1C2, prm2, msmeg_1891*) (DCO), **9** – Δ (*ligC1C2, prm2*) (*msmeg_1891* SCO); **10,11** – Δ (*ligC1C2, prm2, msmeg_1891*) (DCO).



Rycina 5.4. Potwierdzenie genotypu mutantów *M. smegmatis* z delecją w obrębie genu *msmeg_1891* oraz genu *mpg*. Na rycinie przedstawiono schemat trawienia enzymem restrykcyjnym BamHI chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów oraz wyniki analizy Southern blot: **1** – szczep typu dzikiego; **2** – SCO; **3** – **5** – Δmpg (DCO); **6** – $\Delta msmeg_1891$, (*mpg* SCO); **7** - **9** – Δ (*msmeg_1891*, *mpg*) (DCO).



Rycina 5.5. Potwierdzenie genotypu mutantów *M. smegmatis* z delecją w obrębie genów *msmeg_1891, endolV* i *mpg*. Na rycinie przedstawiono schemat trawienia enzymem restrykcyjnym BamHI chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepów oraz wyniki analizy Southern blot: **1** – szczep typu dzikiego, **2** – Δ (*endolV*, *msmeg_1891*) (*mpg* SCO); **3** – **7** – Δ (*endolV*, *msmeg_1891*, *mpg*) (DCO).

Równolegle przystąpiono do konstrukcji mutanta *M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891*, aby następnie analizować jego przeżywalność w niekorzystnych, genotoksycznych warunkach. W tym celu zaprojektowano sekwencje oligonukleotydowe, komplementarne do fragmentu genu *msmeg_1891* (Tabela 3.2.), znajdujące się w odpowiedniej odległości od sekwencji PAM (*z ang.* Protospacer Adjacent Motif), które klonowano do plazmidu pLJR962 (dedykowanego do obniżania poziomu ekspresji genów metodą CRISPR/dCas9 u *M. smegmatis*; Rycina 3.5.), trawionego wcześniej enzymem restrykcyjnym BsmBI. Rekombinowanym plazmidem (pLJR962-↓*msmeg_1891*) transformowano metodą szoku termicznego komórki kompetentne *E. coli* Top 10. Z wybranych transformantów izolowano plazmidowy DNA, który poddano analizie

sekwencyjnej w celu potwierdzenia poprawności klonowania. Następnie rekombinowany plazmid pLJR962-↓*msmeg_1891* wprowadzano metodą elektroporacji do komórek kompetentnych *M. smegmatis.* W celu potwierdzenia integracji plazmidu z chromosomalnym DNA szczepu *M. smegmatis,* z otrzymanych elektrotransformantów izolowano chromosomalny DNA, który wykorzystano jako matrycę w łańcuchowej reakcji polimerazy (ze starterami do fragmentu TetR/Cas9 plazmidu pLJR962, Tabela 3.2.). Otrzymano produkt amplifikacji o spodziewanej wielkości 700 pz (Rycina 5.6.).



700 pz

Rycina 5.6. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR na matrycy chromosomalnego DNA wyizolowanego ze szczepu *M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji *msmeg_1891* (*M. smegmatis*–pLJR962-↓*msmeg_1891*), potwierdzający integrację wektora pLJR962 do genomu mykobakterii. **1** – Standard wielkości GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). **2** – **7** – produkty amplifikacji fragmentu DNA o spodziewanej wielkości ~700 pz, otrzymane na matrycy chromosomalnego DNA, wyizolowanego z elektrotransformantów *M. smegmatis*.

5.2. Fenotypowa analiza przeżywalności szczepów mutantów mykobakterii po ekspozycji na wybrane czynniki genotoksyczne

Zarówno szczep *M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* (*M. smegmatis*-pLJR962-↓*msmeg_1891*), jak i szczepy z delecjami w obrębie genów kodujących badane w pracy białka (Msmeg_1891 i Rv3226c) zostały na dalszym etapie pracy wykorzystane do analiz przeżywalności po ekspozycji na działanie wybranych czynników genotoksycznych. Do analiz fenotypowych wykorzystano także skonstruowane mutanty wielokrotne, pozbawione funkcjonalnych białek uczestniczących w naprawach uszkodzeń DNA u mykobakterii, na drodze BER lub NHEJ (i dodatkowo Msmeg_1891).

Abv określić przeżywalność uzyskanych mutantów М. smegmatis w warunkach genotoksycznych, przeprowadzono ich ekspozycję na działanie szeregu czynników, powodujących różne uszkodzenia DNA, tj.: oksydacyjne - H₂O₂ (nadtlenek wodoru) w stężeniu 20 mM i CHP (wodoronadtlenek kumenu) w stężeniu 10 mM; metylujące zasady azotowe - MMS (metanosulfonian metylu) w stężeniu 0,4%; powodujące pęknięcia nici DNA – promieniowanie UV (promieniowanie ultrafioletowe) w dawkach 5, 10, 20 mJ/cm² i MMC (mitomycyna C) w stężeniu 200 ng/ml). Analizy przeżywalności mutantów przeprowadzono z wykorzystaniem testu punktowego wysiewu hodowli bakteryjnej, potraktowanej czynnikiem uszkadzającym, po wykonaniu szeregu rozcieńczeń hodowli (spot-titer assay) (Rycina 5.7.) oraz metody określania liczby żywych komórek (CFU; colony forming units) dla szczepu z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* (Rycina 5.8.).

Α







С



Rycina 5.7. Ocena przeżywalności szczepów M. smegmatis z delecją w obrębie genu msmeg_1891, oraz dodatkowo genów kodujących funkcjonalne białka naprawy DNA (ku, ligD, ligC1C2, prm2, endoIV, mpg), a także szczepu M. tuberculosis z delecją w obrębie genu rv3226c, po ekspozycji na działanie wybranych czynników genotoksycznych, w porównaniu do szczepów kontrolnych (nie poddanych działaniu badanych czynników) w logarytmicznej fazie wzrostu. \mathbf{A} – Przeżywalność szczepów *M. smegmatis* $\Delta msmeg$ 1891, ∆(*msmeg_*1891, $\Delta(msmeg \ 1891,$ ku), ligD), Δ (msmeg_1891, liqC1C2, prm2), $\Delta(msmeg_1891, ku, ligD, ligC1C2, prm2)$ po ekspozycji na działanie MMC (200 ng/ml przez 3 godz.) oraz promieniowania UV (5, 10, 20 mJ/cm²) w odniesieniu do szczepów kontrolnych nietraktowanych MMC i UV dzikiego. **B** – Przeżywalność szczepów M. smegmatis Δ msmeg 1891, Δ msmeg 1891 :: msmeg 1891, Δ mpg, Δ (msmeg 1891, mpq), Δ (msmeq 1891, endolV), Δ (msmeq 1891, endolV, mpq) po ekspozycji na działanie MMC (200 ng/ml przez 1 i 2 godz.), promieniowania UV (5, 10, 20 mJ/cm²), H₂O₂ (20 mM przez 1 i 2 godz.), CHP (10 mM przez 1 godz.), MMS (0,4% przez 0,5, 1 i 1,5 godz.) w odniesieniu do szczepów nietraktowanych MMC, UV, MMS, CHP i H₂O₂. **C** - Przeżywalność szczepów *M. tuberculosis* Δ*rv3226c* i *M. tuberculosis* H37Rv po ekspozycji na działanie MMS (0,4% przez 0,5 i 1 godz.) w odniesieniu do szczepów nietraktowanych MMS.

Na podstawie analiz fenotypowych, przeprowadzonych dla skonstruowanych mutantów *M. smegmatis* poddanych działaniu szeregu czynników genotoksycznych, zaobserwowano spadek przeżywalności szczepów *M. smegmatis* noszących delecje w obrębie genów *msmeg_1891* i *mpg* [$\Delta msmeg_1891$, Δmpg , $\Delta (msmeg_1891, mpg)$, $\Delta (msmeg_1891, endolV)$, $\Delta (msmeg_1891, endolV, mpg)$] po ekspozycji na działanie 0,4% metanosulfonianu metylu przez 1,5 godz. W przypadku pozostałych, użytych w eksperymencie czynników genotoksycznych (MMC, promieniowania UV, H₂O₂, CHP), nie zaobserwowano spadku przeżywalności nawet w przypadku mutantów wielokrotnych [$\Delta (msmeg_1891, endolV, mpg)$, $\Delta (ku, ligD, ligC1C2, prm2, msmeg_1891)$].

W kolejnych badaniach oceniono przeżywalność szczepu *M. smegmatis* z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* (*M. smegmatis*-pLJR962-*↓msmeg_1891*) po ekspozycji na działanie 0,4% MMS w czasie od 0 - 120 min. poprzez zliczanie jednostek koloniotwórczych (CFU) (Rycina 5. 8).



Rycina 5.8. Analiza przeżywalności mutanta *M. smegmatis*–pLJR962-↓*msmeg_1891* oraz szczepu dzikiego *M. smegmatis*, niosącego pusty plazmid pLJR962 (*M. smegmatis*–pLJR962), po ekspozycji na działanie 0,4% MMS w logarytmicznej fazie wzrostu. Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu t-studenta, wykazano istotność statystyczną *p<0,05.

Na podstawie przeprowadzonych analiz, zaobserwowano spadek przeżywalności szczepu z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* w porównaniu do szczepu typu dzikiego, zawierającego pusty wektor pLJR962, już po upływie 20 min., odnotowując 1000-krotnie mniejszą przeżywalność mutanta w 120 min. eksperymentu. Obserwowany spadek przeżywalności szczepu z obniżonym poziomem ekspresji *msmeg_1891* po działaniu MMS dodatkowo może wskazywać, że zredukowany poziom Msmeg_1891 upośledza proces naprawy uszkodzeń DNA wywoływanych przez ten czynnik.

5.3. Oczyszczanie rekombinowanego białka Msmeg_1891

Aby dokładniej określić rolę Msmeg_1891 w naprawach uszkodzeń DNA, na kolejnym etapie pracy zaplanowano oczyszczanie preparatów rekombinowanego białka w heterologicznych układach *E. coli*.

Do oczyszczania rekombinowanego białka Msmeg 1891 wykorzystano szczepy E. coli BL21 oraz E. coli Rosetta, niosące plazmid pFG6 (fuzja C– końca białka Msmeg_1891 ze znacznikiem polihistydynowym 6 x HIS-tag). Na pierwszym etapie pracy zoptymalizowano warunki indukcji rekombinowanego białka Msmeg 1891. W tym celu przygotowano hodowle ww. szczepów, które inkubowano w różnych wartościach temperatury, tj. 20°C i 37°C, przez 4 godziny lub 16 godzin). Wykazano, że najefektywniejsza indukcja (po zaindukowaniu hodowli 1 mM IPTG) białka Msmeg 1891, zachodziła w temperaturze 20°C, i inkubacji hodowli przez 16 godz., dlatego na dalszych etapach prac wykorzystano te warunki do oczyszczania białka na dużą skalę. Otrzymaną biomasę bakteryjną wstępnie dezintegrowano (Metody 4.4.3.), i oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa na niklowym złożu HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific[™]). Następnie, przystępowano do dodatkowego procesu oczyszczania z wykorzystaniem systemu AKTA Start (GE Healthcare) (Metody 4.4.3.). Otrzymane preparaty wysokooczyszczonego, rekombinowanego białka Msmeg_1891 analizowano poprzez ich rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących SDS -PAGE (Metody 4.4.2.), którego wyniki przedstawiono na Rycinie 5.9.



Rycina 5.9. Rozdział elektroforetyczny SDS–PAGE w 12% żelu poliakrylamidowym frakcji uzyskanych w procesie oczyszczania białka Msmeg_1891. **A** – Oczyszczanie z wykorzystaniem komórek *E. coli* BL21. **B** – Oczyszczanie z wykorzystaniem komórek *E. coli* Rosetta. **1** – Standard wielkości białek PageRuler[™] Unstained Protein Ladder. **2** - Lizat białek komórkowych. **3** – Frakcja białek niezwiązanych do złoża. **4** – Frakcja po płukaniu złoża. **5** – **10** – Frakcje białka Msmeg_1891 otrzymanych po elucji.

Oczyszczony preparat białka Msmeg_1891 został w kolejno zaplanowanych pracach eksperymentalnych wykorzystany do otrzymania przeciwciał anty-Msmeg_1891, oraz do testów jego oddziaływania z różnymi substratami - DNA i RNA, stanowiąc tym samym ważny etap w niniejszej pracy.

Oczyszczone białko, w stężeniu 1 mg/ml, wykorzystano do immunizacji królika (współpraca z dr hab. Bożeną Dziadek prof. UŁ, Katedra Mikrobiologii Molekularnej UŁ), w celu otrzymania poliwalentnej surowicy odpornościowej zawierającej przeciwciała anty-Msmeg_1891. Uzyskana surowica anty-Msmeg_1891 została wykorzystana do potwierdzenia detekcji z badanym białkiem Msmeg_1891, oraz jego homologiem Rv3226c, z zastosowaniem techniki immunodetekcji western blot. Swoistość wiązania przeciwciał anty-Msmeg_1891 dodatkowo zwiększono poprzez ich oczyszczanie z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Pierce[™] Antibody Clean - Up (Metody, 4.4.3.). Na kolejnym etapie pracy, zoptymalizowano miano przeciwciał, stosowane na dalszych etapach badań do oceny poziomu białka Msmeg_1891, które wynosiło 1:3200 (Rycina 5.10.).



Rycina 5.10. Analiza oddziaływania surowicy odpornościowej, zawierającej przeciwciała anty – Msmeg_1891, przed (**A**) i po oczyszczaniu (**B**), z rekombinowanym białkiem Msmeg_1891 i lizatami białkowymi z komórek mykobakterii. **1** – Białko Msmeg_1891. **2** – Lizat białkowy *M. tuberculosis*. **3** – Lizat białkowy *M. smegmatis*. **4** – Lizat białkowy *M. smegmatis* Δ msmeg_1891.

Ponadto, na kolejnym etapie pracy oceniano efektywność obniżenia poziomu ekspresji *msmeg_1891* w szczepie *M. smegmatis*–pLJR962-↓*msmeg_1891*, poprzez zastosowanie techniki immunodetekcji western blot (Metody 4.4.8.), z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko Msmeg_1891 (anty – Msmeg_1891). Jako kontrolę w powyższych analizach wykorzystano surowicę (anty – LigA), z uwagi na relatywnie stały poziom produkcji białka LigA w komórkach *M. smegmatis* (Rycina 5.11.).



Rycina 5.11. Analiza techniką immunodetekcji western blot lizatów komórkowych szczepów *M. smegmatis*–pLJR962 (kontrola) (**3**, **4**, **7**, **8**) oraz *M. smegmatis*–pLJR962- ψ msmeg_1891 (**1**, **2**, **5**, **6**), z wykorzystaniem przeciwciał anty–Msmeg_1891 (**5** - **8**) oraz anty–LigA (**1** – **4**).

5.4. Określenie specyficzności substratowej białka Msmeg_1891

Na kolejnym etapie pracy, białko Msmeg_1891 zostało wykorzystane do potwierdzenia doniesień publikacyjnych (Płociński i in., 2017) o możliwości jego wiązania się z jednoniciowymi substratami DNA i RNA, do czego wykorzystano test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (EMSA). Dodatkowo, przeprowadzono ocenę aktywności Msmeg_1891 z dwuniciowymi substratami DNA zawierającymi syntetycznie wbudowane rybonukleotydy, wykorzystując rozdziały elektroforetyczne w warunkach denaturujących UREA – PAGE.

5.4.1. Test spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (EMSA; *electrophoretic mobility shift assay*)

Aby ocenić specyficzność substratową Msmeg_1891, wykorzystano znakowane heksachlorofluoresceiną (HEX), jednoniciowe substraty DNA (ssDNA) i RNA:

• ssDNA

• RNA

Α

Na pierwszym etapie przygotowano szereg reakcji: białko – substrat. W tym celu zastosowano wzrastającą ilość białka w stężeniu od 0,2 μM do 1 μM i stałą ilość substratów ssDNA lub RNA (12 nM), które następnie poddawano rozdziałowi elektroforetycznemu w 5% natywnych żelach poliakrylamidowych (EMSA). Żele analizowano z wykorzystaniem aparatu Typhoon 8600 przy długości fali wzbudzenia 533 nm. Otrzymane rezultaty pozwoliły na potwierdzenie oddziaływania białka Msmeg_1891 zarówno z substratem ssDNA jak i RNA (Rycina 5.12.).

 1
 ssDNA

 1
 ssDNA

 2-5
 ssDNA

 1
 ssDNA

 1
 2

 3
 4

 6
 6

 1
 2

 3
 4

 1
 2

 3
 4

 1
 2

 3
 4

 5
 ssDNA

 1
 1

 1
 1

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 2
 3

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 2
 3

 1
 2

 1
 2

 2
 3

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 1
 2

 2
 3
</tr



В

Rycina 5.12. Rozdział elektroforetyczny w teście spowolnienia migracji kwasów nukleinowych reakcji białka Msmeg_1891 (**2** – 0,2 μ M; **3** – 0,4 μ M; **4** – 0,8 μ M; **5** – 1 μ M) z jednoniciowymi substratami DNA (**A**) i RNA (**B**) o stężeniu 12 nM, w natywnym żelu poliakrylamidowym (5%).

5.4.2. Test oceny aktywności białka Msmeg_1891 w warunkach denaturujących (UREA – PAGE)

Ze względu na wykazane oddziaływanie białka Msmeg_1891 z substratami DNA i RNA, w celu określenia specyficzności substratowej dla białka Msmeg_1891, przeprowadzano jego reakcje z dwuniciowym substratem DNA, a także substratami zawierającymi w swojej sekwencji syntetycznie wbudowane rybonukleotydy oraz 2'- deoksyurudynę. Nazwy poszczególnych substratów (rC, rA, rr, rG, rCA, rAA, rGT, dU, dU:G i K) umieszczono wraz z graficznymi schematami na Rycinie 5.13.



Rycina 5.13. Dwuniciowe substraty DNA wykorzystane do określenia aktywności białka Msmeg_1891, zawierające syntetycznie wbudowane rybonukleotydy (w tym błędnie sparowane) lub 2'-deoksyurydynę (*).

W wyniku elektroforezy przygotowanych reakcji w 15% żelu poliakrylamidowym, zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) i wizualizacji w aparacie Typhoon 8600 przy długości fali wzbudzenia 535 nm i emisji 556 nm (dla HEX) i 496 nm i 667 nm (dla Cy5) (Metody 4.4.6.) uzyskano wyniki potwierdzające oddziaływanie badanego białka z dwuniciowymi substratami zawierającymi syntetycznie wbudowane rybonukleotydy lub 2'-deoksyurydynę (Rycina 5.14.).

Α



В



Rycina 5.14. Rozdział elektroforetyczny w 15% żelu poliakrylamidowym, zawierającym 7 M mocznik (warunki denaturujące) reakcji białka Msmeg_1891 z dwuniciowymi substratami DNA znakowanymi heksachlorofluoresceiną (HEX; A) i cyjaniną 5 (Cy5; B). Niebieskie strzałki (https://www.new.org">https://www.new.org / - produkt po wycięciu dU i pęknięciu nici. M - marker wielkości, rC, rA, rr, rG, rCA, rAA, rGT, dU – dwuniciowe substraty o sekwencjach przedstawionych na Rycinie 5.13.

Przeprowadzony eksperyment pozwolił na potwierdzenie wiązania się białka Msmeg_1891 ze wszystkimi zastosowanymi substratami dwuniciowego DNA (kompleksy białko – DNA wskazane niebieskimi strzałkami). Dodatkowo białko Msmeg_1891 wykazywało aktywność względem substratu zawierającego 2'-deoksyurydynę, powodując wycinanie 2'-deoksyurydyny i pęknięcie nici znakowanej Cy5 (czerwona strzałka). W celu uzyskania większej efektywności reakcji Msmeg_1891 – dsDNA (dU) przystąpiono do jej optymalizacji.

Optymalizacja warunków reakcji białka Msmeg_1891 z dwuniciowym substratem DNA zawierającym w swojej sekwencji 2'-deoksyurydynę (dU)

W celu optymalizacji warunków reakcji białka Msmeg_1891 z substratem dwuniciowego DNA (dU) przeprowadzano rozdziały elektroforetyczne, w 15% żelach poliakrylamidowych z 7 M mocznikiem (warunki denaturujące), reakcji badanego układu w zmieniających się warunkach, obejmujących:

- Obecność różnych jonów dwuwartościowych, tj. Co²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺ w stężeniu końcowym 1 mM (Rycina 5.15. A)
- Gradient stężeń jonów sodu (Na⁺) i potasu (K⁺), w zakresie od 25 mM do 1 M (odpowiednio Rycina 5.15. B i C).
- Gradient temperatur, od 30 44°C (Rycina 5.15. D).

Kontrolę podczas prowadzenia eksperymentów stanowił substrat dwuniciowego DNA, zawierający 2'-deoksyurydynę (dU) oraz komercyjny enzym – glikozylaza uracyl – DNA (Udg) (New England Biolabs), usuwająca dU z dwuniciowego DNA. Wyniki uzyskanych rozdziałów elektroforetycznych w testowanych warunkach przedstawiono na Rycinie 5.15.



В

Α











Rycina 5.15. Rozdział elektroforetyczny reakcji białka Msmeg_1891 (1 μ M) z dwuniciowym substratem DNA (12 nM) posiadającym w swojej sekwencji 2'-deoksyurydynę (dU) (\downarrow) w 15% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem (warunki denaturujące), przedstawiający: **A** – wpływ obecności poszczególnych jonów dwuwartościowych (1 mM) na aktywność Msmeg_1891; **B** – wpływ obecności stężeń jonu Na⁺ (25 mM – 1 M) na aktywność Msmeg_1891; **C** – wpływ obecności stężeń jonu K⁺ (25 mM – 1 M) na aktywność Msmeg_1891; **D** - wpływ temperatury na aktywność Msmeg_1891. **M** – marker wielkości.

Podsumowując, badania zmierzające do określenia optymalnych warunków reakcji białka Msmeg_1891 z dwuniciowym substratem DNA zawierającym 2'-deoksyurydynę wykazano, że reakcja ta zachodzi z największą efektywnością w obecności jonów Co²⁺, w temperaturze 36°C (przez 90 min) przy stosunku stężeń Msmeg_1891 : dsDNA (dU), wynoszącym 5 μM : 12 nM (Rycina 5.16.).



Rycina 5.16. Rozdział elektroforetyczny zoptymalizowanej reakcji białka Msmeg_1891 (1 μM) z dwuniciowym substratem DNA (12 nM) posiadającym w swojej

sekwencji 2'-deoksyurydynę (dU) (w 15% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem (warunki denaturujące), wobec reakcji kontrolnej z wykorzystaniem komercyjnie dostępnej glikozylazy uracylu DNA - Udg.

W celu dokładniejszego określenia specyficzności zaobserwowanej aktywności białka Msmeg_1891, przeprowadzono jego reakcje z dwuniciowym substratem DNA zawierającym 2'-deoksyurydynę (☆; dsDNA dU) błędnie sparowaną z guaniną (dU:G), w warunkach zoptymalizowanych dla dwuniciowego substratu DNA (dU) (Rycina 5.17.).



dsDNA:



dU:G:



Rycina 5.17. Rozdział elektroforetyczny reakcji białka Msmeg_1891 (0,1 - 1 μM) z dwuniciowym substratem DNA (12 nM) posiadającym w swojej sekwencji 2'-deoksyurydynę (dU:G) (★) w 15% żelu poliakrylamidowym z 7 M mocznikiem (warunki denaturujące). **M** – marker wielkości.

Wyniki przedstawione na Rycinie 5.17. potwierdzają aktywność wycinania 2'-deoksyurydyny z dwuniciowego substratu DNA, błędnie sparowanego z guaniną (dU:G). Stężenie białka Msmeg_1891, niezbędne do całkowitego przereagowania 12 nM substratu wynosiło 1 μM.

5.5. Analiza siły oddziaływania białka Msmeg_1891 z substratami zawierającymi deoksy(uracyl) z wykorzystaniem metody termoforezy mikroskalarnej

Ze względu na wykazaną aktywność Msmeg_1891 wobec substratu zawierającego 2'-deoksyurydynę, aby ocenić siłę oddziaływania Msmeg_1891 z substratami zawierającymi lub niezawierającymi 2'-deoksyurydynę, oraz syntetycznie wbudowany rybonukleotyd (rG), wykorzystano termoforezę mikroskalarną (Metody 4.4.5.). Metoda była oparta na pomiarze zmiany intensywności fluorescencji cząsteczek poruszających się w mikro-gradiencie temperatury. Analizę przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta firmy Nano Temper, przygotowując reakcje badanych substratów (znakowanych cyjaniną 5; Cy5) o stałym stężeniu 15 nM ze wzrastającym stężeniem Msmeg_1891 (od 0,00179 do 7,31 μM). Następnie próbki umieszczano w urządzeniu Monolith NT.115 (Nano Temper), wykorzystując w tym celu zestaw kapilar Monolith Premium Capillaries oraz protokół Monolith His – Tag Labeling Kit RED – tris – NTA 2nd Generation. Wyniki opracowano na aparaturze Monolith NT.115 MicroScale Thermophoresis (Nano Temper technologies) i przedstawiono w graficznym schemacie na Rycinie 5.18., nanosząc na nić DNA wirtualny model struktury białka Msmeg_1891 z wykorzystaniem przewidywalnego modelu Msmeg_1891 (dostępny www.uniprot.org).


Rycina 5.18. Analiza siły oddziaływania Msmeg_1891 z jednoniciowymi substratami
DNA wyznakowanymi cyjaniną 5 (Cy5) z wykorzystaniem termoforezy mikroskalarnej
(MST). Rycina zawiera przewidywalną strukturę białka Msmeg_1891 (www.uniprot.org).
A – Substrat kontrolny (ssDNA). B – Substrat zawierający rG. C – Substrat zawierający dU.
D – Substrat zawierający 10 dU.

Na podstawie przeprowadzonych analiz z wykorzystaniem termoforezy mikroskalarnej potwierdzono zdolność oddziaływania białka Msmeg_1891 z jednoniciowymi substratami DNA. Zaobserwowano, że siła wiązania pomiędzy badanym białkiem a substratem wzrastała wraz ze wzrostem liczby cząsteczek 2'-deoksyurydyny – najsłabsze oddziaływanie zaobserwowano dla substratu bez 2'-deoksyurydyny (**A**) i zawierającego rG (**B**), które stopniowo wzrastało dla substratu z jedną cząsteczką urydyny (**C**), a najsilniejsze oddziaływanie wykazano dla substratu zawierającego 10 urydyn (**D**) (wartość współczynnika Kd malała wraz ze wzrostem liczby 2'-deoksyurydyny), potwierdzając efektywność jej rozpoznawania i oddziaływania z badanym w pracy białkiem.

Podsumowując dotychczasowe badania zmierzające do oceny funkcji białka Msmeg_1891:

- potwierdzono oddziaływania Msmeg_1891 z substratami DNA i RNA,

-określono jego aktywność enzymatyczną, związaną z wycinaniem z dwuniciowego substratu DNA 2'-deoksyurydyny,

wykazano wzrastającą siłę wiązania badanego białka z substratem zawierającym
 2'-deoksyurydynę (im więcej urydyn tym silniejsze wiązanie).

Kolejne badania zmierzały do poszukiwania białek partnerskich, które mogłyby wspólnie z badanym białkiem uczestniczyć w naprawach DNA i precyzyjniej ukierunkować szlak naprawy uszkodzeń, w których białka Msmeg_1891/Rv3226c mogłyby być zaangażowane.

5.6. Identyfikacja białek partnerskich dla białka Msmeg_1891

W celu zidentyfikowania szlaków naprawczych, w których mogłoby być zaangażowane białko Msmeg_1891, postanowiono użyć go jako przynęty dla poszukiwania białek partnerskich. W tym celu skonstruowano szczep *M. smegmatis*, niosący plazmid pJAM-FLAG-TEV-*msmeg_1891*, umożliwiający indukowaną acetamidem nadprodukcję Msmeg_1891 (Rycina 5.19.), jako białka stanowiącego przynętę dla współoczyszczania białek partnerskich. Otrzymane ze szczepów *M. smegmatis*, zawierających plazmid pJAM-FLAG-TEV-*msmeg_1891* (indukowanych acetamidem), próbki analizowano z wykorzystaniem wysokosprawnej spektrometrii mas we współpracy z Instytutem Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Uzyskane wyniki poddano analizie bioinformatycznej w programie MaxQuant v1.6 wykorzystując proteomiczną bazę danych dedykowaną do badań nad prątkami gruźlicy mycobrowser.epfl.ch (École

Polytechnique Fédérale de Lausanne). Otrzymane wyniki potwierdziły specyficzność oczyszczania białka Msmeg_1891 ze względu na jego dominującą ilość w badanych próbkach. Zaobserwowano, że wraz z analizowanym białkiem współoczyszczono kilka białek zaangażowanych w naprawy DNA u mykobakterii: Msmeg_0866 (helikaza DNA lub RNA), Msmeg_3883 (egzonukleaza 5' – 3' DNA) a także Msmeg_4912 (DinG, helikaza o polarności 5' – 3').



Rycina 5.19. Analiza ekspresji białka Msmeg_1891 w lizatach komórkowych uzyskanych ze szczepów *M. smegmatis* pJAM2 – FLAG – TEV – *msmeg_1891*. **1** – Standard wielkości białek PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). **2**, **4** – Lizaty komórkowe z hodowli *M. smegmatis* nieindukowanych acetamidem. **3**, **5** – **10** – Lizaty komórkowe z hodowli indukowanych 0,2% acetamidem.

Kolejne badania nad białkami partnerskimi wymagały w pierwszej kolejności oczyszczenia preparatów białkowych w systemach heterologicznych *E. coli* i wykorzystania ich dla potwierdzenia oddziaływania z badanym białkiem Msemg_1891. Z uwagi na trudności techniczne związane z oczyszczaniem zidentyfikowanych białek partnerskich konieczne są dalsze modyfikacje modeli badawczych.

5.7. Ocena poziomu ekspresji *msmeg_1891* i ilości białka Msmeg_1891 po ekspozycji hodowli na działanie metanosulfonianu metylu (MMS)

Ze względu na zaobserwowany wcześniej fenotyp uwrażliwienia szczepów z zaburzonym poziomem białek SRAP w obecności MMS, na kolejnym etapie prowadzonych badań postanowiono zbadać poziom ekspresji genu msmeg_1891 oraz poziom białka Msmeg 1891 w komórkach szczepu kontrolnego *M. smegmatis* mc² 155, poddanego ekspozycji na działanie tego czynnika. W celu weryfikacji poziomu ekspresji genu msmeg_1891, na pierwszym etapie wyizolowano RNA z hodowli M. smegmatis, będącej w logarytmicznej fazie wzrostu (OD₆₀₀ 0,6-0,8) i poddanej odpowiednio ekspozycji na 0,4% MMS w czasie: 30 min, 60 min i 90 min. Następnie, na matrycy RNA zsyntetyzowano cDNA, który wykorzystano w ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (qRT-PCR), pozwalającej na ilościową analizę powstającego transkryptu msmeg_1891 w czasie rzeczywistym. Kontrolę w badaniach stanowił poziom transkryptu dla sigA, ulegającego stałej, konstytutywnej ekspresji w komórkach Mycobacterium. Analiza otrzymanych wyników ujawniła przyrost transkryptów dla msmeg_1891 pod wpływem MMS. Szczególnie wysoki poziom ekspresji genu msmeg_1891 (1000- krotnie wyższy od kontroli) zaobserwowano po 30 min ekspozycji komórek *M. smegmatis* na działanie MMS (Rycina 5.20).



Rycina 5.20. Analiza poziomu ekspresji *msmeg_1891* po ekspozycji hodowli *M. smegmatis* na działanie 0,4% metanosulfonianu metylu (MMS) w odniesieniu do szczepu kontrolnego (nietraktowanego MMS).

Następnie, dla skorelowania z poziomem transkryptu, postanowiono określić poziom białka Msmeg_1891 u *M. smegmatis* po ekspozycji hodowli na działanie 0,4% metanosulfonianu metylu (MMS). W tym celu, przeprowadzono analizę western blot (Metody, 4.4.8.) wykorzystując lizaty komórkowe *M. smegmatis*, otrzymane z hodowli poddanych działaniu MMS w czasie 30 min, 60 min i 90 min, a także nietraktowane MMS (kontrola) przy zastosowaniu oczyszczonych przeciwciał skierowanych przeciwko białku Msmeg_1891 (Metody, 4.4.3.) (Rycina 5.21.).



Rycina 5.21. Analiza techniką immunodetekcji western blot lizatów komórkowych szczepów *M. smegmatis* po ekspozycji hodowli na 0,4% metanosulfonian metylu (MMS) w odniesieniu do szczepu kontrolnego. Do każdej studzienki żelu załadowano 20 μg białka całkowitego z lizatu komórkowego, na podstawie pomiaru stężenia białka metodą Bradford.

Przeprowadzone analizy western blot pozwoliły na zaobserwowanie wyraźnego wzrostu poziomu białka Msmeg_1891 w szczepie *M. smegmatis* mc², po ekspozycji na działanie 0,4% metanosulfonianu metylu (MMS). Otrzymane wyniki są spójne z analizą poziomu ekspresji genu *msmeg_1891* (qRT-PCR) i mogą świadczyć o istotności badanego w pracy białka w naprawach uszkodzeń DNA wywołanych przez ten związek.

5.8. Analiza transkryptomiczna szczepu *M. tuberculosis* Δrv3226c

W dalszej części pracy przystąpiono do globalnej analizy transkryptomicznej szczepu M. tuberculosis Δrv3226c przed i po ekspozycji na działanie 0,4% MMS w porównaniu do szczepu typu dzikiego M. tuberculosis H37Rv. W tym celu, przygotowano hodowle tego szczepu w płynnym podłożu 7H9/OADC/Tween, do momentu osiągnięcia wartości współczynnika OD₆₀₀ = 0,8(Materiały, 3.6.8.). Na kolejnym etapie, do hodowli dodawano MMS w końcowym stężeniu 0,4% i inkubowano w 37°C przez 30 min, po czym neutralizowano działanie tego czynnika poprzez dodanie równej objętości Na₂S₂O₃. Po inaktywacji, hodowle zawieszano w płynnym podłożu 7H9/OADC/Tween i inkubowano przez 24 godz. w 37°C w celu wywołania odpowiedzi komórki prątka na działanie czynnika uszkadzającego jej materiał genetyczny. Następnie z uzyskanego osadu biomasy bakteryjnej izolowano RNA (Metody, 4.3.1.), stanowiący matrycę do przygotowania bibliotek cDNA (Metody, 4.3.2.). Wyizolowany RNA, wstępnie trawiono DNAzą, poddawano rybodeplecji, oczyszczano z użyciem złoża magnetycznego MagBind a następnie przygotowywano biblioteki do sekwencjonowania techniką RNA-Seq, stosując się do protokołu dla zestawu do przygotowania bibliotek KAPA Roche. Otrzymane biblioteki były sekwencjonowane w ramach współpracy naukowej z pracownią Biobank UŁ, przy użyciu sekwenatora NextSeq550 i odpowiednich zestawów do sekwencjonowania z firmy Illumina. Otrzymywano dane surowe, stanowiące kilka do kilkunastu milionów odczytów dla każdej z próbek, przygotowane co najmniej trzech powtórzeń biologicznych dla każdego ze szczepów i badanych warunków. Analiza bioinformatyczna danych obejmowała kolejno: odcinanie adapterów bibliotek, usuwanie odczytów krótkich i o niskiej jakości, mapowanie do genomu bakteryjnego, zliczanie ilości odczytów do pojedynczych genów na podstawie annotacji genomu i globalną ocenę różnic ekspresji genów. Wyznaczono różnice w ekspresji genów, na poziomie całego genomu zarówno pomiędzy szczepem dzikim jak i delecyjnym (*Δrv3226c*), nietraktowanymi i traktowanymi MMS. Dodatkowo, dla oceny skutków usunięcia białka Rv3226c z komórek prątków, wykonano analizę różnic w ekspresji genów pomiędzy szczepem dzikim a szczepem mutantem delecyjnym, pozbawionym genu rv3226c (Tabela 5.1.). Oceniono także różnice w odpowiedzi na zadziałanie czynnikiem genotoksycznym - 0.4% MMS dla szczepu mutanta delecyjnego względem szczepu dzikiego (Tabela 5.2.) (Rycina 5.22.).



Rycina 5.22. Analiza Volcano Plots (Degust) zmienności ekspresji genów: **A** – pomiędzy szczepem dzikim a delecyjnym ($\Delta rv3226c$), **B** – pomiędzy szczepem dzikim nietraktowanym i traktowanym MMS, **C** – pomiędzy szczepem delecyjnym ($\Delta rv3226c$) nietraktowanym i traktowanym MMS, **D** – pomiędzy szczepem dzikim a delecyjnym ($\Delta rv3226c$) traktowanymi MMS. Wartości odcięcia analizy: FDR = 0,05 i logFC =1.

Przy zastosowaniu wartości odcięcia analizy FDR = 0,05 i logFC = 1 pomiędzy szczepami nietraktowanymi i traktowanymi MMS zaobserwowano zmianę transkrypcji:

- 84 genów dla układu szczep dziki/szczep delecyjny (Δ*rv3226c*)
- 940 genów dla układu szczep dziki +/– MMS
- 882 genów dla układu szczep delecyjny (Δ*rv3226c*) +/– MMS
- 86 genów dla układu szczep dziki/szczep delecyjny (Δ*rv3226c*) + MMS

Tabela 5.1. Profil ekspresji wybranych genów szczepu *M. tuberculosis* Δ*rv3226c* w porównaniu do kontrolnego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv.

Gen	H37Rv	∆rv3226c	FDR	Funkcja
rv0516c	0	-1,51	1,60E-08	regulator czynnika sigma?
rv0530A	0	1,91	2,30E-03	nieznana
rv0554	0	-1,67	1,45E-06	peroksydaza BpoC
rv1331	0	1,51	1,35E-06	nieznana
rv1353c	0	-1,75	0,05	regulator transkrypcji
rv1373	0	1,69	0,04	sulfotransferaza glikolipidowa
rv1552	0	-1,53	4,70E-05	reduktaza fumaranowa FrdA
rv2331	0	1,79	7,76E-03	nieznana
rv2438A	0	-1,65	0,03	nieznana
rv2617c	0	-1,66	6,74E-06	białko przezbłonowe
rv2997	0	-1,52	2,83E-07	nieznana
rv3226c	0	-1,86	5,25E-04	nieznana
rv3395A	0	-1,8	1,19E-06	nieznana
rv3832c	0	1,79	0,01	nieznana

Tabela 5.2. Profil ekspresji wybranych genów szczepu *M. tuberculosis* Δ*rv3226c* po ekspozycji na 0,4% metanosulfonian metylu (MMS) w porównaniu do kontrolnego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv.

Gen	H37Rv	Δrv3226c	FDR	Funkcja
rv0329c	0	-2,26	0,03	nieznana
rv0664	0	-2,19	0,04	przypuszczalnie antytoksyna VapB8
rv1947	0	-1,67	0,03	nieznana
rv2029c	0	1,53	2,54E-07	6-fosfofruktokinaza PfkB
rv2030c	0	1,59	7,34E-09	nieznana
rv2031c	0	2,1	2,29E-10	białko szoku cieplnego hspX
rv2091c	0	1,82	2,54E-07	przypuszczalnie białko membranowe
rv2626c	0	1,85	7,83E-05	białko odpowiedzi na warunki hipoksji

rv2627c	0	1,69	2,86E-04	nieznana
rv2628	0	2,16	6,72E-07	nieznana
rv3072c	0	-2,19	0,02	nieznana
rv3226c	0	-1,71	0,01	nieznana
rv3229c	0	1,99	2,00E-09	desaturaza linoleoilo-CoA desA3
rv3683	0	1,77	4,06E-08	nieznana

Pomimo, że zmiany w profilu ekspresji dla szczepów nietraktowanych i traktowanych MMS były znaczące, to nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy szczepem typu dzikiego a szczepem delecyjnym ($\Delta rv3226c$). Największe zmiany w poziomie ekspresji szczepu delecyjnego ($\Delta rv3226c$) w porównaniu do szczepu dzikiego zaobserwowano dla genów o nieznanej funkcji co utrudnia jednoznaczną interpretację zaobserwowanych zależności.

6. Dyskusja

Prątki z rodzaju Mycobacterium nieustannie narażone są na działanie czynników genotoksycznych, w tym endogennych. Podczas bytowania w organizmie gospodarza, ale też w wyniku własnych endogennych przemian metabolicznych, prątki są narażone na działanie reaktywnych form tlenu i azotu (Lancaster, 1997), powodujących m.in. deaminację cytozyny do uracylu, powstawanie miejsc apurynowych/ apirymidynowych czy konwersję guaniny do 8-oksoguaniny (Kurthkoti i in., 2008). Innym przykładem czynników endogennych jest powstawanie w procesie replikacji DNA czy podczas naprawy uszkodzeń DNA, błędnego parowania nukleotydów, szczególnie w konsekwencji działania polimeraz o niskiej wierności/ mutagennych polimeraz, np. ImuB/DnaE2, DinB i DinB2 (Ditse i in., 2017; Salini i in., 2022; Dupuy i in., 2022). Do najważniejszych czynników egzogennych, powodujących uszkodzenia DNA, zaliczyć można promieniowanie ultrafioletowe (UV) powodujące np. powstawanie dimerów cyklobutanopirymidynowych (Goosen i Moolenaar, 2008) zmieniających strukturę DNA w miejscu uszkodzenia, pochodzące z zanieczyszczonego środowiska chemiczne mutageny oraz wysychanie. Ze względu na wszechobecne czynniki, które potencjalnie mogą prowadzić do uszkodzenia materiału genetycznego mykobakterii, bakterie te musiały wykształcić w swoich komórkach różnorodne systemy napraw uszkodzeń DNA, przyczyniające się do utrzymania integralności ich genomu. W komórkach prątków z rodzaju Mycobacterium zidentyfikowano wszystkie znane szlaki napraw uszkodzeń DNA typowo obecne w komórkach organizmów żywych, tj. szlaki naprawy poprzez BER, NER, NHEJ, HR oraz LexA/RecA – zależny i LexA/RecA – niezależny system naprawy SOS (Singh, 2017), czy system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (MMR) (Castaneda-Garcia i in., 2017). Wszystkie wymienione szlaki napraw uszkodzeń DNA wymagają zaangażowania funkcjonalnych białek naprawczych o specyficznych aktywnościach enzymatycznych, umożliwiających precyzyjne katalizowanie napraw. Wierna eliminacja uszkodzeń DNA przeprowadzana przez białka naprawcze jest niezbędna do utrzymania integralności genomu, właściwej replikacji chromosomu bakteryjnego i zapewnienia żywotności komórek.

Celem prac eksperymentalnych niniejszej rozprawy doktorskiej była weryfikacja roli białek opisywanych jako domniemane czynniki naprawcze, potencjalnie biorące udział w naprawach pęknięć DNA u mykobakterii. Głównym przedmiotem badań były mykobakteryjne białka należące do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SOS-Response Associated Peptidases, SRAP) – Msmeg_1891 (M. smegmatis) i jego homolog Rv3226c (M. tuberculosis), o nieokreślonej dotąd funkcji w naprawach uszkodzeń DNA u tych organizmów. Po raz pierwszy białka należące do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP) zostały scharakteryzowane u organizmów eukariotycznych, w badaniach mających na celu wyselekcjonowanie białek wiążących się do metylowanych substratów DNA (np. 5-hydroksymetylocytozyny), w embrionalnych komórkach myszy, jak należące do tej rodziny C3Orf37 (Spruijt i in., 2013; Aravind i in., 2013), poniekąd ukierunkowując je na możliwość uczestnictwa w naprawach uszkodzeń DNA związanych z jego metylacją. W innych badaniach udowodniono, że białka SRAP mogą brać udział w usuwaniu 5-metylocytozyny poprzez autoproteolizę sprzężoną z aktywacją nukleazy nacinającej zmetylowane miejsce w DNA (Kweon i in., 2017). W przypadku prokariotycznych białek z rodziny SRAP, do niedawna ich funkcja w tych organizmach była bardzo słabo scharakteryzowana, jednak na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować wzrost ilości informacji, prowadzących do wyjaśnienia ich funkcji. Dla przykładu, białko z rodziny SRAP – YedK pochodzące z komórek E. coli wykazywało wiązanie z uszkodzeniami jednoniciowego DNA (imitującymi miejsca apurynowe/apirymidynowe), sugerując możliwość jego uczestnictwa w naprawach z wycinaniem zasady azotowej (Wang i in., 2019). Dodatkowo białko to posiada aktywność bezpośredniej regeneracji miejsc AP poprzez rewersję wiązań białko-DNA (Paulin i in., 2022).

Pierwsze doniesienia publikacyjne o możliwości uczestnictwa badanych w niniejszej rozprawie doktorskiej białek (Msmeg_1891 i Rv3226c) w naprawach uszkodzeń DNA u mykobakterii pochodziły z prac, w których badano funkcje białek w szlaku naprawy z wycinaniem uszkodzonej zasady azotowej (BER). Wykazano w nich z zastosowaniem techniki spektrometrii mas, że Msmeg_1891 może wiązać się z substratami DNA, imitującymi pojedyncze i podwójne pęknięcia w ciągłości nici DNA (Płociński i in., 2017). Ponadto, w badaniach przeprowadzonych w celu molekularnego scharakteryzowania degradosomu RNA *M. tuberculosis*, poprzez zastosowanie techniki sieciowania wiązań

RNA-białko wykazano, że homolog białka Msmeg_1891 – Rv3226c jest jednym z najsilniej wiążących się białek z RNA (Płociński i in., 2019).

Ważnym etapem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawczych DNA – Msmeg 1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju Mycobacterium. Ze względu na doniesienia publikacyjne, sugerujące udział tych białek w naprawach uszkodzeń DNA, na pierwszym etapie pracy przystąpiono do konstrukcji szczepu M. smegmatis z obniżonym poziomem ekspresji msmeg 1891, opierając się na metodzie, w której wykorzystywano wektor pLJR962, przekazany z laboratorium twórcy (Sarah Fortune), na zasadach współpracy naukowej i dzielenia się wypracowanymi narzędziami inżynierii genetycznej. Wektor ten służy do obniżania poziomu ekspresji genów u *M. smegmatis*. W celu obniżenia poziomu ekspresji badanego genu, na pierwszym etapie skonstruowano plazmid pLJR962-msmeg_1891, którego użyto do transformacji komórek kompetentnych M. smegmatis. Plazmid ten – indukowalny anhydrotetracykliną – umożliwiał powstanie w komórkach prątków kompleksu białka Cas9 z inaktywowaną domeną nukleolityczną (dCas9), wiążącego się do sekwencji PAM (Protospacer Adjacent Motif) w okolicach odpowiednio zaprojektowanego fragmentu sgRNA, komplementarnego do fragmentu genu *msmeg 1891*. Kompleks związany silnie i specyficznie z zaprojektowanym, ściśle określonym miejscem w chromosomalnym DNA M. smegmatis uniemożliwiał progresję transkrypcji, poprzez zablokowanie dostępu DNA- zależnej polimerazy RNA do okludowanego fragmentu DNA. W ten sposób, otrzymany szczep, *M.* smegmatis–pLJR962- \downarrow msmeg_1891, został wykorzystany do analiz fenotypowych po ekspozycji na działanie metanosulfonianu metylu (MMS), powodującego metylację DNA. było podyktowane wcześniejszymi doniesienia publikacyjnymi, Takie działanie sugerującymi możliwość uczestnictwa białek z rodziny SRAP w naprawach związanych z metylacją DNA. Otrzymane wyniki, oparte na określaniu liczby żywych komórek w 1 ml badanej hodowli wykazały znaczący spadek (3 log) przeżywalności badanego szczepu, względem szczepu typu dzikiego M. smegmatis mc², co potwierdziło możliwość uczestnictwa Msmeg 1891 w naprawach związanych z metylacją DNA.

Pomimo wysokiej specyficzności i wydajności działania systemu wyciszania ekspresji genów z użyciem narzędzi dCas9/CRISPRi możliwe jest występowanie zjawiska niezamierzonego wyciszania również innych transkryptów zawierających podobną

sekwencję docelową (efekt off-target) (Guo i in., 2023). Na kolejnym etapie pracy, w celu dokładniejszego poznania funkcji badanych białek w naprawach uszkodzeń DNA i jako alternatywa dla dCas9/CRISPRi, skonstruowano szczepy, mutanty M. smegmatis i *M. tuberculosis* z delecjami w obrębie genów kodujących Msmeg_1891 (*M. smegmatis*) lub Rv3226c (M. tuberculosis). Ponadto, przygotowano mutanty delecyjne pozbawione genów kodujących białka SRAP oraz dodatkowo pozbawione innych funkcjonalnych białek napraw DNA o znanej funkcji (Materiały, Tabela 3.1.). Uzyskane szczepy delecyjne oraz szczepy z wyciszeniem ekspresji genów kodujących białka SRAP zostały następnie poddane analizom fenotypowym po ekspozycji na różne czynniki uszkadzające DNA. Określono wrażliwość szczepów na działanie takich czynników genotoksycznych jak: mitomycyna C (MMC, 200 ng/ml), promieniowanie ultrafioletowe (UV, 5-20 mJ/cm²), nadtlenek wodoru (H₂O₂, 20 mM), wodoronadtlenek kumenu (CHP, 10 mM) oraz metanosulfonian metylu (MMS, 0,4%), z zastosowaniem testu punktowego wysiewu hodowli bakteryjnej potraktowanej czynnikiem uszkadzającym po wykonaniu szeregu rozcieńczeń hodowli (Płociński i in., 2017; Brzostek i in., 2021). Wybrana technika będąca znacznym uproszczeniem klasycznej metody określania jednostek koloniotwórczych (CFU), pozwala na szybkie (choć zgrubne) wykrycie zmian uwrażliwienia lub nabycia oporności badanych szczepów bakterii na testowany czynnik uszkadzający DNA. Zastosowana technika posłużyła jako test przesiewowy.

Przeprowadzone analizy fenotypowe pozwoliły na zaobserwowanie spadku przeżywalności szczepów mutantów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*, z delecjami w obrębie genów kodujących badane w niniejszej pracy białka, tj. Msmeg_1891 i Rv3226c, po ekspozycji na działanie metanosulfonianu metylu (MMS). Związek ten odpowiedzialny jest za modyfikację guaniny do 7-metyloguaniny i adeniny do 3-metyloguaniny poprzez alkilację grupami metylowymi, powodując tym samym uszkodzenia naprawiane najczęściej przez szlak naprawy z wycinaniem zasady azotowej (BER), generując powstawanie miejsc apurynowych/apirymidynowych (AP/APE) (Lundin i in., 2005). Miejsca pozbawione zasady azotowej stanowią źródło niestabilności genetycznej, z czasem półtrwania między 200 a 900 godz. (Chen i in., 2008) a konsekwencją ich występowania mogą być pęknięcia pojedynczej nici DNA (single strand break, SSB), mogące w rezultacie doprowadzić do pęknięcia obu nici (double strand break, DSB) (Feng i in., 2022). Ze względu na wpływ

metanosulfonianu metylu na integralność i stabilność genomu, prawdopodobnie rola badanych w niniejszej rozprawie doktorskiej białek, należących do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzą SOS (SRAP), jest znacząca w naprawach uszkodzeń powodowanych przez ten związek.

Żeby lepiej zrozumieć mechanizm uwrażliwienia prątków pozbawionych białek SRAP na MMS, zweryfikowano poziom transkryptów oraz białka Msmeg_1891 po ekspozycji hodowli *M. smegmatis* mc² na działanie metanosulfonianu metylu (MMS). Przygotowano hodowle tego szczepu, którą następnie traktowano 0,4% stężeniem badanego związku, zabezpieczając biomasę bakterii po uszkodzeniu, a następnie z otrzymanych osadów bakteryjnych izolowano RNA, wykorzystany w dalszej części pracy jako matryca do syntezy cDNA i przeprowadzenia ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą qRT – PCR. Ponadto, z osadu hodowli przygotowywano lizaty komórkowe w warunkach denaturujących, niezbędne do przeprowadzenia weryfikacji poziomu białka Msmeg_1891 z zastosowaniem techniki western blot i przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku (anty-Msmeg_1891). Otrzymane wyniki wskazują na istotny wzrost poziomu ekspresji *msmeg_1891*, który po 30 min inkubacji z MMS był 1000 x większy w porównaniu ze szczepem nietraktowanym tym związkiem. Eksperyment z wykorzystaniem techniki western blot dodatkowo potwierdził znaczący wzrost poziomu białka Msmeg_1891 w hodowlach traktowanych 0.4% MMS.

Przeprowadzone analizy fenotypowe oraz analizy poziomu ekspresji *msmeg_1891* i ilości białka Msmeg_1891 w hodowlach mykobakterii traktowanych metanosulfonianem metylu (MMS), wskazują na zaangażowanie badanych w pracy białek w naprawach związanych z uszkodzeniami DNA wywołującymi metylację DNA. W komórkach ludzkich MMS powoduje aktywację szlaku napraw BER, gdzie główną glikozylazą DNA uczestniczącą w naprawach jest enzym Mag1, usuwający 3-metyloadeninę, pozostawiając miejsce apurynowe/apirymidynowe (Ma i in., 2011). Uszkodzenia MMS są na tyle rozległe, że w konsekwencji mogą powodować powstawania pęknięć podwójnej nici DNA (DSBs) lub zablokowanie replikacji DNA, co jest uznawane za główny mechanizm bójczy po zadziałaniu MMS (Lundin i in., 2012). Usunięcie endonukleaz zaangażowanych w naprawę miejsc AP u organizmów eukariotycznych może znacząco zwiększać wrażliwość na działanie MMS, natomiast w przypadku dodatkowej delecji w obrębie genu kodującego MAG1

3-metyloadeninową glikozylazę DNA, zmniejsza wrażliwość na ten związek u *Saccharomyces cerevisiae* (Xiao i in., 2001). W przypadku badań przeprowadzonych w niniejszej pracy, delecja genu glikozylazy 3- metyloadeniny DNA *mpg*, oraz dodatkowo endonukleazy *endolV* i badanego w pracy genu *msmeg_1891* nie spowodowała podobnego efektu.

Dla przeprowadzenia testów aktywności białka SRAP, ale również dla otrzymania przeciwciał odpornościowych skierowanych przeciwko SRAP, niezbędne było uzyskanie preparatów czystego białka Msmeg 1891. Konstrukcja wektorów do nadprodukcji białka Msmeg 1891 w heterologicznych układach E. coli była kilkuetapowa, co doprowadziło do uzyskania rekombinowanych wektorów pET28a noszących msmeg_1891 w fuzji N- i Ckońca ze znacznikiem polihistydynowym 6x HIS. Otrzymane rekombinowane plazmidy pFG5 (6x HIS przy N- końcu) i pFG6 (6x HIS przy C- końcu) posłużyły do transformacji komórek kompetentnych i przygotowania heterologicznych układów E. coli Rosetta i E. coli BL21 (DE 3), wykorzystanych na dalszym etapie pracy do indukcji i oczyszczania Msmeg 1891. Uzyskane poprzez wykorzystanie chromatografii metalopowinowactwa preparaty białka, zostały na kolejnym etapie pracy dodatkowo oczyszczone przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w systemie AKTA Start (GE Healthcare) na kolumnie jonowymiennej i do filtracji żelowej. Białka z rodziny SRAP posiadają wysoce konserwowany genetycznie N-koniec, przy którym po usunięciu N- formylometioniny odsłaniany jest właściwy- katalityczny aminokwas N- końcowy. U E. coli, białko YedK należące do rodziny SRAP jest zdolne do wiązania miejsc AP w DNA poprzez cysteinę występującą na N- końcu (Thompson i in., 2019). Z tego względu, aby zachować natywny koniec N białka, do badań biochemicznych używano białka w fuzji C-końcowej ze znacznikiem polihistydynowym 6x HIS (Materiały, Tabela 3.4.).

Ze względu na doniesienia publikacyjne o możliwości wiązania się białka Msmeg_1891 z substratami DNA (Płociński i in., 2017), a także silnym oddziaływaniu białka Rv3226c z RNA (Płociński i in., 2019), po uzyskaniu preparatów czystego białka Msmeg_1891 przystąpiono do analizy wiązania białko-DNA i białko-RNA z zastosowaniem testów retardacji DNA w żelu poliakrylamidowym po związaniu z białkiem (technika EMSA, *z ang.* Electro- mobility shift- assay). Na podstawie przeprowadzonych analiz

zaobserwowano, że Msmeg_1891 jest zdolne do wiązania się zarówno z DNA i RNA z tendencją do mocniejszej interakcji z RNA.

Zarówno spadek przeżywalności szczepów z delecją w obrębie genów *msmeg_1891* jak i *rv3226c*, wzrost poziomu ekspresji *msmeg_1891* i ilości białka Msmeg_1891 w szczepie typu dzikiego po ekspozycji hodowli na działanie metanosulfonianu metylu sugerować mogło, że badane w pracy białka uczestniczą w naprawie związanej z wycinaniem zasady azotowej (BER). Aby zweryfikować postawioną tezę i dokładniej poznać funkcję badanych białek, przeprowadzono ich reakcje z różnymi substratami dwuniciowego DNA, zawierającego w swojej sekwencji uracyl lub syntetycznie wbudowane rybonukleotydy, w tym błędnie sparowane. Uzyskane reakcje rozdzielano w denaturujących żelach poliakrylamidowych z 7 M mocznikiem, w celu uzyskania poziomu rozdzielczości do 1 nukleotydu. Z przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że białko Msmeg_1891 najsilniej oddziałuje z substratem dwuniciowego DNA, zawierającym w swojej sekwencji (deoksy)uracyl (dU).

W warunkach środowiskowych, dzikie szczepy *M. smegmatis*, do wycinania uracylu z DNA wykorzystują białka należące do rodziny glikozylaz DNA uracylu – UDG (Naz i in., 2021), a zaobserwowana aktywność Msmeg_1891 wobec substratu z (deoksy)uracylem sugerowała podobieństwo badanego białka do takich enzymów.

W celu weryfikacji, przeprowadzono reakcję dwuniciowego DNA zawierającego uracyl (sparowany z adeniną) z białkiem Msmeg 1891 (we wzrastającym stężeniu), oraz dodatkowo komercyjnie dostępną glikozylazą DNA – Udg, która stanowiła kontrolę eksperymentu. Dodatkową kontrolę stanowiły reakcję obu białek z dwuniciowym DNA o niezmienionej sekwencji (bez uracylu). Otrzymane wyniki potwierdziły zdolność białka Msmeg_1891 do aktywności podobnej, do tej wykazywanej przez komercyjną glikozylazę DNA – Udg, tj. specyficznego wycinania tej zasady azotowej z dwuniciowego DNA. Na kolejnym etapie pracy warunki reakcji zoptymalizowano, a następnie przeprowadzono reakcje Msmeg 1891 z dwuniciowym substratem DNA zawierającym uracyl błędnie sparowany z guaniną. Uzyskane poprzez rozdział w denaturującym żelu poliakrylamidowym efektywniej 5-krotnie wykazały, że białko to (w steżeniu mniejszym w porównaniu do reakcji z dU:A) powoduje wycinanie uracylu, w momencie jego błędnego sparowania. Obecność w genomie prątków często występujących par G:C sprzyja

deaminacji cytozyny i powstawania par G:U, wpływając negatywnie na stabilność genomu (Naz i in., 2021). Powstanie takich par jest szczególnie niebezpieczne w przypadku braku ich naprawy przed kolejną rundą replikacyjną, z uwagi na powstające w jej wyniku pary A:T (G:C \rightarrow G:U \rightarrow A:T) (Krokan i Bjørås, 2013). Zaobserwowana aktywność Msmeg_1891 w wycinaniu uracylu sparowanego z adeniną oraz – efektywniejszego – w momencie gdy uracyl sparowany jest z guaniną, świadczyć może o znaczącej roli tego białka w naprawach związanych z wycinaniem rybonukleotydów, RER (ribonucleotide excision repair).

Na kolejnym etapie pracy, w celu zweryfikowania siły z jaką Msmeg 1891 oddziałuje z substratami zawierającymi (lub nie) syntetycznie wbudowany uracyl, przeprowadzono termoforezę w mikroskali na urządzeniu Monolith NT.115 (Metody, 4.4.5.). Otrzymane wyniki pozwoliły na zaobserwowanie wzrostu siły oddziaływania badanego białka wraz ze wzrastającą ilością uracylu w sekwencji syntetycznych oligunukleotydów, co dodatkowo sugeruje istotną rolę badanego w pracy białka do naprawy związanej z wycinaniem uracylu. Demetylacja 5-metylocytozyny (5mC) u organizmów eukariotycznych zachodzi przy udziale białek dioksygenaz metylocytozyny TET (z ang. ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases). Katalizują one trzyetapową konwersję 5-mC kolejno do 1) 5-2) hydroksymetylocytozyny (5hmC), następnie przekształcanej do 5-formylometylocytozyny (5-fC) i wreszcie do 3) 5-karboksylcytozyny (5-caC) (Meng i in., 2015). Dodatkowo, w wyniku działania białek TET może powstawać 5hydroksymetylouracyl (5-hmU). Zarówno 5-hmU jak i 5-fC oraz 5-caC są rozpoznawane jako niestabilność genetyczna i stanowią substraty napraw dla glikozylazy tyminowej – TDG lub SMUG1 (Wu i Zhang, 2017). W momencie odkrycia białek SRAP wskazywano, że są one w stanie wiązać produkty demetylacji przy udziale białek TET i uczestniczą w rekrutacji szeregu innych białek naprawczych (Aravind i in., 2013). Jest prawdopodobne, że enzymy z rodziny SRAP rozpoznają deoksyuracyl w DNA na zasadzie podobnej do rozpoznawania 5hmC, 5-fC, 5-caC oraz 5-hmU gdzie wszystkie te zasady azotowe można potraktować jako oksydowane formy cytozyny. Powinowactwo białek SRAP do głównego produktu oksydacyjnej deaminacji 5-hydroksymetylocytozyny, czyli 5-hydroksymetylouracylu zostanie sprawdzone w badaniach następujących już po zakończeniu badań przewidzianych do realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

We wspomnianych powyżej badaniach nad ludzkim białkiem z rodziny SRAP, wskazano, że są one zaangażowane w rekrutację czynników naprawczych niezbędnych do eliminacji niestabilności w postaci oksydowanych pochodnych cytozyny. W niniejszej pracy doktorskiej również podjęto próbę identyfikacji partnerów oddziaływań białek SRAP, tworzących funkcjonalne kompleksy białkowe i uczestniczące w tym samym szlaku napraw uszkodzeń DNA. Aby określić potencjalne białka partnerskie oddziałujące z Msmeg_1891, skonstruowano plazmid pJAM-FLAG-TEV-msmeg_1891, którym transformowano komórki kompetentne *M. smegmatis*. Uzyskany szczep *M. smegmatis*, niosący rekombinowany plazmid hodowano w płynnym podłożu Middlebrook 7H9/Tween/OADC, z dodatkiem 0,2% acetamidu, co umożliwiło ekspresję genu msmeg_1891, którą potwierdzono wykorzystaniem techniki western blot i przeciwciał anty–Msmeg 1891. Ζ Z tak przygotowanych hodowli przygotowywano lizaty komórkowe, z których izolowano kompleksy białkowe partnerów oddziaływań białka SRAP przy zastosowaniu technik chromatografii powinowactwa do złóż opłaszczonych przeciwciałami anty-FLAG. Identyfikację partnerów oddziaływania białka SRAP przeprowadzono z wykorzystaniem wysokosprawnej spektrometrii mas na zasadzie usługi badawczej w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Otrzymane spektra masowe były analizowane przez członka zespołu badawczego IBM PAN, względem randomizowanej, proteomicznej bazy danych, dedykowanej dla prątków gruźlicy (Płociński i in., 2014, baza aktualizowana z https://mycobrowser.epfl.ch/v.4 z dnia 23-03-2021). Analiza ilościowa wykazała wiązanie się Msmeg_1891 do kilku białek uczestniczących w naprawach uszkodzeń DNA u mykobakterii, tj. Msmeg_3883 (egzonukleaza 5'-3' DNA) analogiczna do domeny egzonukleazowej białka PolA, Msmeg_0866 (helikaza DNA lub RNA) czy Msmeg_4912 (DinG, helikaza o polarności 5'-3'). Polimerazy DNA odgrywają kluczową rolę w wielu naprawach uszkodzeń DNA, zapewniając replikację i zachowanie integralności genomu. Polimeraza PolA może usuwać hybrydy RNA i jest rekrutowana w miejsce widełek replikacyjnych po indukcji uszkodzenia DNA (Hernández-Tamayo i in., 2019). Pomimo, że białko DinG pochodzące z M. tuberculosis nie wykazuje aktywności wiązania z DNA, posiada zdolność do rozwijania substratów przypominających pośrednie produkty napraw uszkodzeń DNA, czy zablokowanych widełek replikacyjnych (Thakur i in., 2014). Badane w pracy białko Msmeg 1891, poprzez możliwość wiązania DNA i RNA, oraz aktywność

wycinania z sekwencji DNA rybonukleotydów, może oddziaływać z ww. białkami w uszkodzonych fragmentach DNA.

Zrealizowane w niniejszej pracy zadania badawcze, zmierzające do poznania funkcji potencjalnych białek naprawy uszkodzeń DNA u mykobakterii – Msmeg 1891 i Rv3226c – należących do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP), pozwoliły na szczegółową charakterystykę białek należących do rodziny SRAP, poprzez analizy mutantów delecyjnych i wykrycie fenotypu uwrażliwienia na MMS oraz określenie specyficzności substratowej i zdefiniowanie aktywności enzymatycznej białka Msmeg 1891. Przeprowadzone badania na temat napraw uszkodzeń DNA u mykobakterii i ich adaptacji do niesprzyjających warunków, prowadzących m.in. do metylacji DNA i obecności w jego sekwencji uracylu, spowodowanej np. poprzez deaminację cytozyny lub działanie mutagennych polimeraz w globalnej odpowiedzi SOS oraz uzyskany na ich podstawie zakres informacji, zostanie rozwinięty w dalszych badaniach, niemieszczących się w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Mechanizm działania metanosulfonianu metylu (MMS) na DNA, polega w dominującej części na metylacji puryn, a w konsekwencji powstawaniu 7-metyloguaniny i 3-metyloadeniny (Singh, 2017; Van der Veen i Tang, 2015). Takie zmiany usuwane są na drodze naprawy z wycinaniem zasady azotowej (BER) lub ulegają spontanicznej depurynacji prowadząc do powstania miejsc apurynowych (Steininger i in., 2010). Przypuszczalna funkcja Msmeg 1891 w naprawach uszkodzeń DNA może polegać na usuwaniu całej palety niestabilnych oksydowanych form cytozyny, a ze względu na podobieństwo struktury także uracylu, podobnie jak glikozylaza DNA uracylu – Udg, np. w warunkach silnego stresu środowiskowego (Naz i in., 2021). Ze względu na śladową aktywność nukleolityczną względem substratów DNA, zawierających inne nukleotydy niż 2'-deoksyurydyna, na Rycinie 6.1. przedstawiono przypuszczalny model naprawy uszkodzeń DNA przez Msmeg 1891, rozpoznający głównie ten nukleotyd.





Rycina 6.1. Schemat przedstawiający proponowany udział białka Msmeg_1891 w naprawach uszkodzeń DNA u prątków *M. smegmatis*.

7. Wnioski i stwierdzenia końcowe

- Wykazano udział białek Msmeg_1891 i Rv3226c w naprawie uszkodzeń DNA spowodowanych działaniem metanosulfonianu metylu (MMS, czynnika metylującego zasady azotowe DNA) poprzez konstrukcję mutantów delecyjnych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*, pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_1891* i *rv3226c* oraz mutanta z obniżonym poziomem ekspresji genu *msmeg_1891* i ich analizy fenotypowe.
- Oczyszczono preparaty rekombinowanego białka Msmeg_1891 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym (6x HIS) i wykazano zdolność wiązania się Msmeg_1891 do jedno- i dwuniciowych substratów DNA/RNA, w tym zawierających syntetycznie wprowadzone rybonukleotydy lub 2'-deoksyurydynę.
- Określono specyficzność substratową dla białka Msmeg_1891, wskazując na aktywność enzymatyczną podobną do glikozylazy uracyl-DNA - Udg związaną z wycinaniem uracylu z dwuniciowego substratu DNA.
- Wytypowano białka partnerskie dla Msmeg_1891, które są anotowane jako potencjalne białka uczestniczące w naprawach szkodzeń DNA u *Mycobacterium* (PolA, DinG, helikaza DNA lub RNA).

Powyższe badania pozwalają wskazać funkcję białek Msmeg_1891/Rv3226c w korygowaniu uszkodzeń DNA u prątków z rodzaju *Mycobacterium,* w procesach usuwania uszkodzonych zasad azotowych (BER). Naprawa dotyczy niestabilności genetycznych generowanych w wyniku akumulacji nukleotydów zbliżonych strukturalnie do 5-deoksyuracylu w DNA w wyniku jego ekspozycji na czynniki powodujące metylację cytozyn, takie jak MMS.

8. Streszczenie

Prątki z rodzaju *Mycobacterium* nieustannie narażone są na działanie czynników genotoksycznych, prowadzących do uszkodzeń DNA. Z tego powodu w ich komórkach niezbędna jest obecność funkcjonalnych białek zaangażowanych w naprawy materiału genetycznego. Jednym ze stosunkowo niedawno zidentyfikowanych białek o nieznanej funkcji, przypuszczalnie biorącym udział w takich naprawach, jest należące do rodziny peptydaz związanych z odpowiedzią SOS (SRAP) Msmeg_1891 (*M. smegmatis*) oraz jego homolog Rv3226c (*M. tuberculosis*) (Płociński i in., 2017; Płociński i in., 2019).

Celem niniejszej pracy doktorskiej była analiza funkcjonalna potencjalnych białek naprawy DNA – Msmeg_1891 i Rv3226c – u prątków z rodzaju Mycobacterium. Na pierwszym etapie, zaplanowano konstrukcję mutantów delecyjnych M. smegmatis i *M. tuberculosis*, z delecjami w obrębie genów *msmeg_1891* i *rv3226c*, a także mutantów wielokrotnych *M.* smegmatis, pozbawionych funkcjonalnych białek napraw, zaangażowanych m.in. w BER lub NHEJ oraz dodatkowo białka Msmeg_1891. Skonstruowano także szczep z obniżonym poziomem ekspresji genu msmeg_1891 z wykorzystaniem metody CRISPRi/dCas9. Następnie, wszystkie uzyskane mutanty poddano analizom fenotypowym po uszkodzeniach DNA, wywołanych działaniem wybranych czynników genotoksycznych, tj. MMC, promieniowanie UV, H₂O₂, CHP i MMS. Przeprowadzone analizy pozwoliły na zaobserwowanie uwrażliwienia szczepów pozbawionych białek Rv3226c i Msmeg_1891 (lub z jego obniżonym poziomem) po ekspozycji na działanie 0,4% MMS. Na kolejnym etapie, przystąpiono do oczyszczania rekombinowanego białka Msmeg 1891 w fuzji ze znacznikiem polihistydynowym (HIS-tag) w heterologicznych układach E. coli BL21 i E. coli Rosetta. W tym celu wykorzystano technikę chromatografii metalopowinowactwa na złożu niklowym oraz wysokosprawną chromatografię cieczową AKTA Start. Uzyskanie preparatów Msmeg 1891 stanowiło kamień milowy niniejszej pracy, ze względu na ich wykorzystanie w dalszej części pracy. Po uzyskaniu białka Msmeg_1891, przystąpiono do otrzymywania poliwalentnej surowicy odpornościowej, zawierającej przeciwciała anty-Msmeg_1891 (surowicę uzyskano na zasadzie współpracy z dr hab. Bożeną Dziadek, prof. UŁ, z Katedry Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego). Przeciwciała następnie oczyszczono i ustalono ich

miano eksperymentalne, wynoszące 1:3200. Na kolejnym etapie wykazano zdolność Msmeg 1891 do wiązania jednoniciowych substratów DNA (ssDNA) i RNA z wykorzystaniem testu spowolnienia migracji kwasów nukleinowych w żelu poliakrylamidowym w warunkach natywnych (EMSA). Wyznaczono także aktywność białka Msmeg 1891, polegającą na wycinaniu 2'-deoksyurydyny z dwuniciowego substratu DNA, na zasadzie podobnej do glikozylazy uracyl-DNA (Udg). Co więcej, siła wiązania Msmeg_1891 z jednoniciowymi substratami zawierającymi (bądź nie), została zweryfikowana z użyciem termoforezy mikroskalarnej. Wykazano silniejsze wiązanie Msmeg 1891 do substratu, wraz ze wzrostem liczby 2'-deoksyurydyn. W celu sprecyzowania ścieżki naprawy, w której mogłoby uczestniczyć badane białko, poszukiwano białek partnerskich z wykorzystaniem Msmeg_1891 jako przynęty, co pozwoliło na wytypowanie Msmeg_3883 (egzonukleaza 5'-3' DNA) analogiczna do domeny egzonukleazowej białka PolA, Msmeg_0866 (helikaza DNA lub RNA) czy Msmeg_4912 (DinG, helikaza o polarności 5'-3'), jako potencjalnych partnerów dla badanego białka. Na kolejnym etapie pracy analizowano poziom ekspresji msmeg_1891, który był 1000 – krotnie wyższy po ekspozycji hodowli *M. smegmatis* na działanie MMS. Znacząco wyższy był także poziom białka Msmeg 1891, co zostało potwierdzone z wykorzystaniem techniki western blot i przeciwciał anty-Msmeg_1891. W celu określenia zmienności poziomu transkryptów określonych genów w komórkach M. tuberculosis Δrv3226c po działaniu MMS, przeprowadzono globalną analizę transkryptomu po działaniu tego związku, w której wykazano znaczącą odpowiedź szczepów traktowanych MMS, jednak różnica pomiędzy szczepem M. tuberculosis Δrv3226c a kontrolą (szczepem dzikim) była stosunkowo niewielka.

Przeprowadzone badania pozwoliły na dokładną charakterystykę białka Msmeg_1891 (Rv3226c), poprzez zaobserwowanie uwrażliwienia mutantów pozbawionych *msmeg_1891/rv3226c* (oraz szczepu z obniżonym poziomem białka Msmeg_1891) na działanie MMS, sugerując udział tych białek w naprawach uszkodzeń DNA wynikających z metylacji zasad azotowych. Ponadto, wykazano zdolność wiązania Msmeg_1891 z substratami DNA i RNA, a także możliwość wycinania 2'-deoksyurydyny z dwuniciowego substratu DNA, co może świadczyć o podobieństwie badanych w pracy białek do białka glikozylazy uracyl – DNA.

9. Abstract

Mycobacterium species are constantly exposed to genotoxic agents, leading to DNA damage. For this reason, their cells require the presence of functional proteins involved in the repair of genetic material. One of the relatively recently identified proteins of unknown function, presumably involved in such repairs, is Msmeg_1891 (M. smegmatis) and its homologue Rv3226c (M. tuberculosis) that belong to the SOS response family (SRAP) (Płociński et al., 2017; Płociński et al., 2019).

The aim of this doctoral thesis was the functional analysis of potential DNA repair proteins - Msmeg 1891 and Rv3226c - in mycobacteria of the genus Mycobacterium. In the first stage, the construction of M. smegmatis deletion mutants and M. tuberculosis, with deletions within the msmeg_1891 and rv3226c genes, as well as multiple mutants of M. smegmatis, devoid of functional repair proteins, involved, e.g., in BER or NHEJ and additionally the Msmeg 1891 protein. A strain with reduced expression of the msmeg 1891 gene was also constructed using the CRISPRi/dCas9 method. Then, all obtained mutants were subjected to phenotypic analyzes after DNA damage caused by selected genotoxic factors, i.e. MMC, UV radiation, H2O2, CHP and MMS. The analyzes carried out allowed to observe the sensitization of strains lacking Rv3226c and Msmeg_1891 proteins (or with its reduced level) after exposure to 0.4% MMS. In the next step, purification of the recombinant Msmeg 1891 protein in fusion with a polyhistidine tag (HIS-tag) was started in the heterologous systems of E. coli BL21 and E. coli Rosetta. For this purpose, metal affinity chromatography on a nickel deposit and high-performance liquid chromatography AKTA Start were used. Obtaining the Msmeg 1891 preparations was a milestone of this work, due to their use in the further part of the work. After obtaining the Msmeg_1891 protein, the preparation of polyvalent antiserum containing anti-Msmeg 1891 antibodies was started (the serum was obtained in cooperation with Dr. Bożena Dziadek, professor of the University of Lodz, Department of Molecular Microbiology, University of Lodz). The antibodies were then purified to an experimental titer of 1:3200. In the next step, the ability of Msmeg_1891 to bind single-stranded DNA (ssDNA) and RNA substrates was demonstrated using the electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The activity of the Msmeg_1891 protein was also determined, which consists of the cleavage of 2'-deoxyuridine from the double-stranded DNA substrate, in a manner

like that of uracil-DNA glycosylase (Udg). Moreover, the binding strength of Msmeg 1891 to single-stranded substrates containing (or not) was verified using microscale thermophoresis. Stronger binding of Msmeg_1891 to the substrate was demonstrated, along with an increase in the number of 2'-deoxyuridines. To specify the repair pathway in which the tested protein could participate, partner proteins were searched using Msmeg_1891 as bait, which allowed the selection of Msmeg_3883 (DNA 5'-3' exonuclease) analogous to the exonuclease domain of the PolA protein, Msmeg_0866 (DNA or RNA helicase) or Msmeg 4912 (DinG, 5'-3' helicase) as potential partners for the protein under study. In the next stage of the work, the expression level of msmeg_1891 was analysed, which was 1000 times higher after exposure of M. smegmatis cultures to MMS. The Msmeg_1891 protein level was also significantly higher, which was confirmed using western blot and anti-Msmeg_1891 antibodies. To determine the variability of the transcript levels of specific genes in M. tuberculosis Δrv3226c cells after MMS treatment, a global transcriptome analysis after MMS treatment with this compound was performed, which showed a significant response of the MMS treated strains, however, the difference between the M. tuberculosis $\Delta rv3226c$ strain and the control (wild type strain) was relatively small.

The studies carried out allowed for precise characterization of the Msmeg_1891 (Rv3226c) protein by observing the sensitization of mutants lacking msmeg_1891/rv3226c (and strain with a reduced level of Msmeg_1891 protein) to MMS, suggesting the participation of these proteins in the repair of DNA damage resulting from the methylation of nitrogenous bases. In addition, Msmeg_1891 was shown to be able to bind to DNA and RNA substrates, as well as the possibility of cutting 2'-deoxyuridine from the double-stranded DNA substrate, which may indicate the similarity of the proteins studied in this work to the uracil-DNA glycosylase protein.

10. Literatura

- Alsøe, L., Sarno, A., Carracedo, S., Domanska, D., Dingler, F., Lirussi, L., SenGupta, T., Tekin, N. B., Jobert, L., Alexandrov, L. B., Galashevskaya, A., Rada, C., Sandve, G. K., Rognes, T., Krokan, H. E., & Nilsen, H. (2017). Uracil Accumulation and Mutagenesis Dominated by Cytosine Deamination in CpG Dinucleotides in Mice Lacking UNG and SMUG1. *Scientific Reports, 7*(1), 7199. https://doi.org/10.1038/s41598-017-07314-5
- Amidon, K. M., & Eichman, B. F. (2020). Structural biology of DNA abasic site protection by SRAP proteins. *DNA Repair*, *94*, 102903. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102903
- Aniukwu, J., Glickman, M. S., & Shuman, S. (2008). The pathways and outcomes of mycobacterial NHEJ depend on the structure of the broken DNA ends. *Genes & Development*, 22(4), 512–527. https://doi.org/10.1101/gad.1631908
- Aravind, L., & Koonin, E. V. (2001). Prokaryotic homologs of the eukaryotic DNAend-binding protein Ku, novel domains in the Ku protein and prediction of a prokaryotic double-strand break repair system. *Genome Research*, *11*(8), 1365– 1374. https://doi.org/10.1101/gr.181001
- Aravind, L., Anand, S., & Iyer, L. M. (2013). Novel autoproteolytic and DNA-damage sensing components in the bacterial SOS response and oxidized methylcytosineinduced eukaryotic DNA demethylation systems. *Biology Direct, 8*, 20. https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-20
- Banasik, M., & Sachadyn, P. (2014). Conserved motifs of MutL proteins. *Mutation Research*, 769, 69–79. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.07.006
- Bartlett, E. J., Brissett, N. C., & Doherty, A. J. (2013). Ribonucleolytic resection is required for repair of strand displaced nonhomologous end-joining intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), E1984-1991. https://doi.org/10.1073/pnas.1302616110
- Bertrand, C., Thibessard, A., Bruand, C., Lecointe, F., & Leblond, P. (2019). Bacterial NHEJ: A never ending story. *Molecular Microbiology*, 111(5), 1139–1151.

https://doi.org/10.1111/mmi.14218

- Bessman, M. J., Frick, D. N., & O'Handley, S. F. (1996). The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25059–25062. https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25059
- Biswas, T., Clos, L. J., SantaLucia, J., Mitra, S., & Roy, R. (2002). Binding of specific DNA base-pair mismatches by N-methylpurine-DNA glycosylase and its implication in initial damage recognition. *Journal of Molecular Biology*, *320*(3), 503–513. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00519-3
- Brzostek, A., Gąsior, F., Lach, J., Żukowska, L., Lechowicz, E., Korycka-Machała, M., Strapagiel, D., & Dziadek, J. (2021). ATP-Dependent Ligases and AEP Primases Affect the Profile and Frequency of Mutations in Mycobacteria under Oxidative Stress. *Genes*, 12(4), 547. https://doi.org/10.3390/genes12040547
- Brzostek, A., Płociński, P., Minias, A., Ciszewska, A., Gąsior, F., Pawełczyk, J., Dziadek, B., Słomka, M., & Dziadek, J. (2021). Dissecting the RecA-(In)dependent Response to Mitomycin C in Mycobacterium tuberculosis Using Transcriptional Profiling and Proteomics Analyses. *Cells*, *10*(5), 1168. https://doi.org/10.3390/cells10051168
- Castañeda-García, A., Prieto, A. I., Rodríguez-Beltrán, J., Alonso, N., Cantillon, D., Costas, C., Pérez-Lago, L., Zegeye, E. D., Herranz, M., Plociński, P., Tonjum, T., García de Viedma, D., Paget, M., Waddell, S. J., Rojas, A. M., Doherty, A. J., & Blázquez, J. (2017). A non-canonical mismatch repair pathway in prokaryotes. *Nature Communications*, 8(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms14246
- Chen, J., Dupradeau, F.-Y., Case, D. A., Turner, C. J., & Stubbe, J. (2008). DNA oligonucleotides with A, T, G or C opposite an abasic site: Structure and dynamics. *Nucleic Acids Research*, *36*(1), 253–262. https://doi.org/10.1093/nar/gkm622
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, *393*(6685), 537–544. https://doi.org/10.1038/31159
- 16. Ditse, Z., Lamers, M. H., & Warner, D. F. (2017). DNA Replication in Mycobacterium

tuberculosis.MicrobiologySpectrum,5(2).https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBTB2-0027-2016

- Doherty, A. J., Jackson, S. P., & Weller, G. R. (2001). Identification of bacterial homologues of the Ku DNA repair proteins. *FEBS Letters*, *500*(3), 186–188. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02589-3
- Dupuy, P., Ghosh, S., Adefisayo, O., Buglino, J., Shuman, S., & Glickman, M. S. (2022). Distinctive roles of translesion polymerases DinB1 and DnaE2 in diversification of the mycobacterial genome through substitution and frameshift mutagenesis. *Nature Communications*, *13*(1), 4493. https://doi.org/10.1038/s41467-022-32022-8
- Endutkin, A. V., & Zharkov, D. O. (2021). (GO System, a DNA Repair Pathway to Cope with Oxidative Damage). *Molekuliarnaia Biologiia*, 55(2), 223–242. https://doi.org/10.31857/S0026898421020063
- 20. Espinosa-Pereiro, J., Sánchez-Montalvá, A., Aznar, M. L., & Espiau, M. (2022). MDR Tuberculosis Treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(2), 188. https://doi.org/10.3390/medicina58020188
- 21. Falkinham, J. O. (2015). Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine*, *36*(1), 35–41. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.003
- Fedrizzi, T., Meehan, C. J., Grottola, A., Giacobazzi, E., Fregni Serpini, G., Tagliazucchi, S., Fabio, A., Bettua, C., Bertorelli, R., De Sanctis, V., Rumpianesi, F., Pecorari, M., Jousson, O., Tortoli, E., & Segata, N. (2017). Genomic characterization of Nontuberculous Mycobacteria. *Scientific Reports,* 7, 45258. https://doi.org/10.1038/srep45258
- 23. Feng, Y., Zhang, Y., Li, J., Omran, R. P., Whiteway, M., & Feng, J. (2022). Transcriptional Profiling of the Candida albicans Response to the DNA Damage Agent Methyl Methanesulfonate. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7555. https://doi.org/10.3390/ijms23147555
- Ferraris, D. M., Miggiano, R., Rossi, F., & Rizzi, M. (2018). Mycobacterium tuberculosis Molecular Determinants of Infection, Survival Strategies, and Vulnerable Targets. *Pathogens (Basel, Switzerland), 7*(1), 17. https://doi.org/10.3390/pathogens7010017
- 25. Forbes, B. A., Hall, G. S., Miller, M. B., Novak, S. M., Rowlinson, M.-C., Salfinger, M.,

Somoskövi, A., Warshauer, D. M., & Wilson, M. L. (2018). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2), e00038-17. https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17

- Franco-Paredes, C., Marcos, L. A., Henao-Martínez, A. F., Rodríguez-Morales, A. J., Villamil-Gómez, W. E., Gotuzzo, E., & Bonifaz, A. (2018). Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(1), e00069-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00069-18
- Friedman-Ohana, R., Karunker, I., & Cohen, A. (1998). Chi-dependent intramolecular recombination in Escherichia coli. *Genetics*, 148(2), 545–557. https://doi.org/10.1093/genetics/148.2.545
- Fudrini Olivencia, B., Müller, A. U., Roschitzki, B., Burger, S., Weber-Ban, E., & Imkamp, F. (2017). Mycobacterium smegmatis PafBC is involved in regulation of DNA damage response. *Scientific Reports, 7*(1), 13987. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14410-z
- 29. Gao, B., & Gupta, R. S. (2012). Phylogenetic Framework and Molecular Signatures for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 76*(1), 66–112. https://doi.org/10.1128/MMBR.05011-11
- Glickman, M. S. (2014). Double-Strand DNA Break Repair in Mycobacteria. Microbiology Spectrum, 2(5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0024-2013
- Goosen, N., & Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. DNA Repair, 7(3), 353–379. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.09.002
- Gopaul, K. K., Brooks, P. C., Prost, J.-F., & Davis, E. O. (2003). Characterization of the two Mycobacterium tuberculosis recA promoters. *Journal of Bacteriology*, *185*(20), 6005–6015. https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6005-6015.2003
- Green, R., & Rogers, E. J. (2013). Transformation of chemically competent E. coli. *Methods in Enzymology*, 529, 329–336. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8
- 34. Guo, C., Ma, X., Gao, F., & Guo, Y. (2023). Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 11, 1143157. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1143157
- 35. Guo, Y., Bandaru, V., Jaruga, P., Zhao, X., Burrows, C. J., Iwai, S., Dizdaroglu, M.,

Bond, J. P., & Wallace, S. S. (2010). The oxidative DNA glycosylases of Mycobacterium tuberculosis exhibit different substrate preferences from their Escherichia coli counterparts. *DNA Repair*, *9*(2), 177–190. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.11.008

- 36. Gupta, R. S., Lo, B., & Son, J. (2018). Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. *Frontiers in Microbiology*, 9, 67. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067
- 37. Gupta, R., Barkan, D., Redelman-Sidi, G., Shuman, S., & Glickman, M. S. (2011).
 Mycobacteria exploit three genetically distinct DNA double-strand break repair pathways. *Molecular Microbiology*, *79*(2), 316–330. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07463.x
- 38. Gupta, R., Ryzhikov, M., Koroleva, O., Unciuleac, M., Shuman, S., Korolev, S., & Glickman, M. S. (2013). A dual role for mycobacterial RecO in RecA-dependent homologous recombination and RecA-independent single-strand annealing. *Nucleic Acids Research*, 41(4), 2284–2295. https://doi.org/10.1093/nar/gks1298
- Gupta, R., Shuman, S., & Glickman, M. S. (2015). RecF and RecR Play Critical Roles in the Homologous Recombination and Single-Strand Annealing Pathways of Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, *197*(19), 3121–3132. https://doi.org/10.1128/JB.00290-15
- 40. Gupta, R., Unciuleac, M.-C., Shuman, S., & Glickman, M. S. (2017). Homologous recombination mediated by the mycobacterial AdnAB helicase without end resection by the AdnAB nucleases. *Nucleic Acids Research*, 45(2), 762–774. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1130
- Honda, J. R., Virdi, R., & Chan, E. D. (2018). Global Environmental Nontuberculous Mycobacteria and Their Contemporaneous Man-Made and Natural Niches. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2029. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029
- Hu, J., Selby, C. P., Adar, S., Adebali, O., & Sancar, A. (2017). Molecular mechanisms and genomic maps of DNA excision repair in Escherichia coli and humans. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(38), 15588–15597. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.807453
- 43. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V., & Modrich, P. L. (2006). DNA mismatch repair:

Functions and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(2), 302–323. https://doi.org/10.1021/cr0404794

- 44. Khanam, T., Afsar, M., Shukla, A., Alam, F., Kumar, S., Soyar, H., Dolma, K., Pasupuleti, M., Srivastava, K. K., Ampapathi, R. S., & Ramachandran, R. (2020). M. tuberculosis class II apurinic/ apyrimidinic-endonuclease/3'-5' exonuclease (XthA) engages with NAD+-dependent DNA ligase A (LigA) to counter futile cleavage and ligation cycles in base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 48(8), 4325–4343. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa188
- 45. Kisker, C., Kuper, J., & Van Houten, B. (2013). Prokaryotic Nucleotide Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3), a012591. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012591
- 46. Krokan, H. E., & Bjørås, M. (2013). Base excision repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(4), a012583. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583
- 47. Kurthkoti, K., & Varshney, U. (2011). Base excision and nucleotide excision repair pathways in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland), 91*(6), 533–543. https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.06.005
- Kurthkoti, K., Kumar, P., Jain, R., & Varshney, U. (2008). Important role of the nucleotide excision repair pathway in Mycobacterium smegmatis in conferring protection against commonly encountered DNA-damaging agents. *Microbiology (Reading, England), 154*(Pt 9), 2776–2785. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019638-0
- 49. Kweon, S.-M., Zhu, B., Chen, Y., Aravind, L., Xu, S.-Y., & Feldman, D. E. (2017).
 Erasure of Tet-Oxidized 5-Methylcytosine by a SRAP Nuclease. *Cell Reports*, *21*(2), 482–494. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.055
- Lancaster, J. R. (1997). A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1(1), 18–30. https://doi.org/10.1006/niox.1996.0112
- 51. Laureti, L., Demol, J., Fuchs, R. P., & Pagès, V. (2015). Bacterial Proliferation: Keep Dividing and Don't Mind the Gap. *PLoS Genetics*, 11(12), e1005757. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005757
- 52. Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H., &

Helleday, T. (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, *33*(12), 3799–3811. https://doi.org/10.1093/nar/gki681

- 53. Ma, W., Westmoreland, J. W., Gordenin, D. A., & Resnick, M. A. (2011). Alkylation base damage is converted into repairable double-strand breaks and complex intermediates in G2 cells lacking AP endonuclease. *PLoS Genetics*, 7(4), e1002059. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002059
- Mallikarjun, J., SaiSree, L., Himabindu, P., Anupama, K., Reddy, M., & Gowrishankar, J. (2022). Modulation of RecFORQ- and RecA-Mediated Homologous Recombination in Escherichia coli by Isoforms of Translation Initiation Factor IF2. *Journal of Bacteriology*, 204(4), e0056921. https://doi.org/10.1128/jb.00569-21
- 55. Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., & Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(4), 368–384. https://doi.org/10.1002/em.22267
- 56. Meehan, C. J., Barco, R. A., Loh, Y.-H. E., Cogneau, S., & Rigouts, L. (2021). Reconstituting the genus Mycobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(9), 004922. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922
- 57. Meng, H., Cao, Y., Qin, J., Song, X., Zhang, Q., Shi, Y., & Cao, L. (2015). DNA methylation, its mediators and genome integrity. *International Journal of Biological Sciences*, 11(5), 604–617. https://doi.org/10.7150/ijbs.11218
- Mittal, P., Sinha, R., Kumar, A., Singh, P., Ngasainao, M. R., Singh, A., & Singh, I. K. (2020). Focusing on DNA Repair and Damage Tolerance Mechanisms in Mycobacterium tuberculosis: An Emerging Therapeutic Theme. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(5), 390–408. https://doi.org/10.2174/1568026620666200110114322
- Mohni, K. N., Wessel, S. R., Zhao, R., Wojciechowski, A. C., Luzwick, J. W., Layden, H., Eichman, B. F., Thompson, P. S., Mehta, K. P. M., & Cortez, D. (2019). HMCES Maintains Genome Integrity by Shielding Abasic Sites in Single-Strand DNA. *Cell*, *176*(1–2), 144-153.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.055
- Moolla, N., Goosens, V. J., Kana, B. D., & Gordhan, B. G. (2014). The contribution of Nth and Nei DNA glycosylases to mutagenesis in Mycobacterium smegmatis. *DNA Repair*, 13, 32–41. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.11.003

- Müller, A. U., Imkamp, F., & Weber-Ban, E. (2018). The Mycobacterial LexA/RecA-Independent DNA Damage Response Is Controlled by PafBC and the Pup-Proteasome System. *Cell Reports, 23*(12), 3551–3564. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.073
- Mullins, E. A., Rodriguez, A. A., Bradley, N. P., & Eichman, B. F. (2019). Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(9), 765–781. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.006
- Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H., Salem, A. M. H., Izumi, S., Pack, S. P., Makino, K., & Ide, H. (2007). Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Molecular Cell, 28*(1), 147–158. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.029
- 64. Naz, S., Dabral, S., Nagarajan, S. N., Arora, D., Singh, L. V., Kumar, P., Singh, Y., Kumar, D., Varshney, U., & Nandicoori, V. K. (2021). Compromised base excision repair pathway in Mycobacterium tuberculosis imparts superior adaptability in the host. *PLoS Pathogens*, *17*(3), e1009452. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009452
- 65. Neeley, W. L., & Essigmann, J. M. (2006). Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, 19(4), 491–505. https://doi.org/10.1021/tx0600043
- 66. Pagès, V. (2016). Single-strand gap repair involves both RecF and RecBCD pathways. *Current Genetics*, *62*(3), 519–521. https://doi.org/10.1007/s00294-016-0575-5
- 67. Paulin, K. A., Cortez, D., & Eichman, B. F. (2022). The SOS response-associated peptidase (SRAP) domain of YedK catalyzes ring opening of abasic sites and reversal of its DNA-protein cross-link. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(9), 102307. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102307
- Pitcher, R. S., Brissett, N. C., Picher, A. J., Andrade, P., Juarez, R., Thompson, D., Fox, G. C., Blanco, L., & Doherty, A. J. (2007). Structure and function of a mycobacterial NHEJ DNA repair polymerase. *Journal of Molecular Biology*, *366*(2), 391–405. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.046
- 69. Płociński, P., Brissett, N. C., Bianchi, J., Brzostek, A., Korycka-Machała, M., Dziembowski, A., Dziadek, J., & Doherty, A. J. (2017). DNA Ligase C and Prim-PolC

participate in base excision repair in mycobacteria. *Nature Communications*, 8(1), 1251. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01365-y

- 70. Płociński, P., Macios, M., Houghton, J., Niemiec, E., Płocińska, R., Brzostek, A., Słomka, M., Dziadek, J., Young, D., & Dziembowski, A. (2019). Proteomic and transcriptomic experiments reveal an essential role of RNA degradosome complexes in shaping the transcriptome of Mycobacterium tuberculosis. *Nucleic Acids Research*, 47(11), 5892–5905. https://doi.org/10.1093/nar/gkz251
- 71. Podlesek, Z., & Žgur Bertok, D. (2020). The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Frontiers in Microbiology, 11,* 1785. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785
- 72. Rand, L., Hinds, J., Springer, B., Sander, P., Buxton, R. S., & Davis, E. O. (2003). The majority of inducible DNA repair genes in Mycobacterium tuberculosis are induced independently of RecA. *Molecular Microbiology*, 50(3), 1031–1042. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03765.x
- 73. Rodgers, K., & McVey, M. (2016). Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 15–24. https://doi.org/10.1002/jcp.25053
- 74. Sachadyn, P. (2010). Conservation and diversity of MutS proteins. *Mutation Research*, 694(1–2), 20–30. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.08.009
- Salini, S., Bhat, S. G., Naz, S., Natesh, R., Kumar, R. A., Nandicoori, V. K., & Kurthkoti,
 K. (2022). The Error-Prone Polymerase DnaE2 Mediates the Evolution of Antibiotic
 Resistance in Persister Mycobacterial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3), e0177321. https://doi.org/10.1128/AAC.01773-21
- 76. Schofield, M. J., & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: Molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology*, 57, 579–608. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090847
- 77. Selby, C. P., Lindsey-Boltz, L. A., Yang, Y., & Sancar, A. (2020). Mycobacteria excise DNA damage in 12- or 13-nucleotide-long oligomers by prokaryotic-type dual incisions and performs transcription-coupled repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(50), 17374–17380. https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.016325
- 78. Sharma, S. K., & Upadhyay, V. (2020). Epidemiology, diagnosis & treatment of nontuberculous mycobacterial diseases. *The Indian Journal of Medical Research*, 152(3),

185–226. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_902_20

- 79. Shibutani, S., Takeshita, M., & Grollman, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349(6308), 431–434. https://doi.org/10.1038/349431a0
- Singh, A. (2017). Guardians of the mycobacterial genome: A review on DNA repair systems in Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology (Reading, England)*, 163(12), 1740–1758. https://doi.org/10.1099/mic.0.000578
- Sinha, K. M., Unciuleac, M.-C., Glickman, M. S., & Shuman, S. (2009). AdnAB: A new DSB-resecting motor-nuclease from mycobacteria. *Genes & Development*, 23(12), 1423–1437. https://doi.org/10.1101/gad.1805709
- 82. Smollett, K. L., Smith, K. M., Kahramanoglou, C., Arnvig, K. B., Buxton, R. S., & Davis, E. O. (2012). Global analysis of the regulon of the transcriptional repressor LexA, a key component of SOS response in Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 22004–22014. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.357715
- Sowa, D. J., Warner, M. M., Tetenych, A., Koechlin, L., Balari, P., Rascon Perez, J. P., Caba, C., & Andres, S. N. (2022). The Mycobacterium tuberculosis Ku C-terminus is a multi-purpose arm for binding DNA and LigD and stimulating ligation. *Nucleic Acids Research*, 50(19), 11040–11057. https://doi.org/10.1093/nar/gkac906
- 84. Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., Eberl, H. C., Mensinga, A., Brinkman, A. B., Lephikov, K., Müller, U., Walter, J., Boelens, R., van Ingen, H., Leonhardt, H., ... Vermeulen, M. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, *152*(5), 1146–1159. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.004
- 85. Steininger, S., Ahne, F., Winkler, K., Kleinschmidt, A., Eckardt-Schupp, F., & Moertl, S. (2010). A novel function for the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1853–1865. https://doi.org/10.1093/nar/gkp1175
- 86. Stephanou, N. C., Gao, F., Bongiorno, P., Ehrt, S., Schnappinger, D., Shuman, S., & Glickman, M. S. (2007). Mycobacterial nonhomologous end joining mediates mutagenic repair of chromosomal double-strand DNA breaks. *Journal of*

Bacteriology, 189(14), 5237–5246. https://doi.org/10.1128/JB.00332-07

- 87. Thakur, M., Agarwal, A., & Muniyappa, K. (2021). The intrinsic ATPase activity of Mycobacterium tuberculosis UvrC is crucial for its damage-specific DNA incision function. *The FEBS Journal*, 288(4), 1179–1200. https://doi.org/10.1111/febs.15465
- Thompson, P. S., Amidon, K. M., Mohni, K. N., Cortez, D., & Eichman, B. F. (2019). Protection of abasic sites during DNA replication by a stable thiazolidine protein-DNA cross-link. *Nature Structural & Molecular Biology*, *26*(7), 613–618. https://doi.org/10.1038/s41594-019-0255-5
- 89. van der Veen, S., & Tang, C. M. (2015). The BER necessities: The repair of DNA damage in human-adapted bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 13(2), Article 2. https://doi.org/10.1038/nrmicro3391
- 90. Verma, P., & Greenberg, R. A. (2016). Noncanonical views of homology-directed DNA repair. *Genes & Development*, 30(10), 1138–1154. https://doi.org/10.1101/gad.280545.116
- 91. Vértessy, B. G., & Tóth, J. (2009). Keeping uracil out of DNA: Physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. Accounts of Chemical Research, 42(1), 97–106. https://doi.org/10.1021/ar800114w
- 92. Wang, B.-B., Xu, J.-Z., Zhang, F., Liu, S., Liu, J., & Zhang, W.-G. (2022). Review of DNA repair enzymes in bacteria: With a major focus on AddAB and RecBCD. DNA Repair, 118, 103389. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2022.103389
- 93. Wang, N., Bao, H., Chen, L., Liu, Y., Li, Y., Wu, B., & Huang, H. (2019). Molecular basis of abasic site sensing in single-stranded DNA by the SRAP domain of E. coli yedK. *Nucleic Acids Research*, 47(19), 10388–10399. https://doi.org/10.1093/nar/gkz744
- 94. Weller, G. R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L. M., Scanlan, E., Della, M., Devine, S. K., Day, J. P., Wilkinson, A., d'Adda di Fagagna, F., Devine, K. M., Bowater, R. P., Jeggo, P. A., Jackson, S. P., & Doherty, A. J. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science (New York, N.Y.), 297*(5587), 1686–1689. https://doi.org/10.1126/science.1074584
- 95. Wigley, D. B. (2013). Bacterial DNA repair: Recent insights into the mechanism of RecBCD, AddAB and AdnAB. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(1), 9–13. https://doi.org/10.1038/nrmicro2917
- 96. Wipperman, M. F., Heaton, B. E., Nautiyal, A., Adefisayo, O., Evans, H., Gupta, R.,
van Ditmarsch, D., Soni, R., Hendrickson, R., Johnson, J., Krogan, N., & Glickman, M. S. (2018). Mycobacterial Mutagenesis and Drug Resistance Are Controlled by Phosphorylation- and Cardiolipin-Mediated Inhibition of the RecA Coprotease. *Molecular Cell*, *72*(1), 152-161.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.037

- 97. Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 18(9), 517–534. https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33
- 98. Xiao, W., Chow, B. L., Hanna, M., & Doetsch, P. W. (2001). Deletion of the MAG1 DNA glycosylase gene suppresses alkylation-induced killing and mutagenesis in yeast cells lacking AP endonucleases. *Mutation Research*, 487(3–4), 137–147. https://doi.org/10.1016/s0921-8777(01)00113-6
- 99. Yamada, H., Chikamatsu, K., Aono, A., Murata, K., Miyazaki, N., Kayama, Y., Bhatt, A., Fujiwara, N., Maeda, S., & Mitarai, S. (2020). Fundamental Cell Morphologies Examined With Cryo-TEM of the Species in the Novel Five Genera Robustly Correlate With New Classification in Family Mycobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, 11, 562395. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562395
- Yamamoto, K., Low, B., Rutherford, S. A., Rajagopalan, M., & Madiraju, M.
 V. (2001). The Mycobacterium avium-intracellulare complex dnaB locus and protein intein splicing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 898– 903. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4202
- Zhang, A. P. P., Pigli, Y. Z., & Rice, P. A. (2010). Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 466(7308), 883–886. https://doi.org/10.1038/nature09200