

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

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 nieznannej 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 mikroskalarniej. 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 anti-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.