



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

INSTYTUT



BiolMed

Stacjonarne Studia Doktoranckie

Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

Ewelina Lechowicz

Enzymy zaangażowane w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii

Enzymes involved in the 3' end of tRNA
maturation in mycobacteria

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Genetyki
i Fizjologii Mycobacterium
Instytutu Biologii Medycznej
PAN w Łodzi

Promotor:
prof. dr. hab. Jarosław Dziadek

→ Łódź, 2023

*Składam serdeczne podziękowania
Panu prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi,
za opiekę, cierpliwość, wnikliwe dyskusje,
Pani dr hab. Annie Brzostek,
Panu dr Przemysławowi Płocińskiemu
oraz całemu zespołowi
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
za pomoc przy realizacji tej pracy i niezapomnianą atmosferę.*

Spis treści

Wykaz skrótów.....	6
1. Wstęp.....	8
1.1. Rodzaje RNA w komórce bakteryjnej.....	8
1.2. Funkcje małych RNA.....	9
1.3. Niekodujący RNA (ncRNA) u Mykobakterii	13
1.4. Funkcja mikro RNA u bakterii.....	13
1.5. Dojrzewanie niekodującego RNA.....	14
1.5.1. rRNA.....	14
1.5.2. sRNA	14
1.5.3. tRNA.....	15
1.6. Kontrola jakości transkryptów tRNA.....	16
1.7. Polimeraza poli(A).....	17
1.8. Nukleotydylotransferaza tRNA.....	18
1.9. Ezgonukleazy.....	19
1.9.1. RNaza PH	20
1.9.2. RNaza T.....	21
1.9.3. Rola RNazy T w kontroli jakości RNA.....	22
1.9.4. RNaza Z.....	23
1.9.5. RNaza D.....	24
2. Cel pracy	26
3. Materiały	27
3.1. Szczepy bakteryjne.....	27
3.2. Podłoża mikrobiologiczne	27
3.3. Substancje dodawane do podłoży	29
3.4. Syntetyczne oligonukleotydy DNA wykorzystane w pracy	29
3.5. Wektory plazmidowe	34
3.6. Wektory plazmidowe skonstruowane w IBM PAN Łódź w ramach realizacji pracy doktorskiej.....	36
3.7. Enzymy	38
3.8. Mieszaniny reakcyjne.....	39
3.9. Bufory i roztwory.....	41
3.10. Markery wielkości.....	45

3.11.	Żele do elektroforezy.....	45
3.12.	Pozostałe odczynniki	46
3.13.	Zestawy komercyjne wykorzystane w badaniach	48
3.14.	Aparatura.....	48
4.	Metody	49
4.1	Hodowle bakteryjne	49
4.2.	Izolacja plazmidowego DNA z komórek <i>E. coli</i>	50
4.3.	Izolacja chromosomalnego DNA	50
4.4.	Izolacja całkowitego RNA z komórek <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i>	50
4.5.	Amplifikacja DNA przy pomocy reakcji PCR	51
4.6.	Trawienie enzymami restrykcyjnymi	51
4.7.	Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym.....	51
4.8.	Elucja DNA z żeli agarozowych	52
4.9.	Precypitacja DNA.....	52
4.10.	Łączenie fragmentów DNA.....	52
4.11.	Pomiar stężenia DNA i RNA.....	52
4.12.	Sekwencjonowanie fragmentów DNA	52
4.13.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i> z zastosowaniem chlorku rubidu	52
4.14.	Transformacja metodą szoku cieplnego	53
4.15.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>M. smegmatis</i>	53
4.16.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>M. tuberculosis</i>	53
4.17.	Elektrotransformacja komórek <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i>	54
4.18.	Konstrukcja plazmidów do nadekspresji rekombinowanych białek	54
4.19.	Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek <i>E. coli</i>	55
4.20.	Doczyszczanie białek z wykorzystaniem systemu AKTA start	55
4.21.	Oznaczanie stężenia białka	55
4.22.	Jednokierunkowa elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	56
4.23.	Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej.....	56
4.24.	Otrzymywanie mutantów SCO i DCO	56
4.25.	Poszukiwanie mutantów SCO i DCO	57
4.26.	Hybrydyzacja metodą Southern blot	59
4.27.	Analiza wzrostu szczepów <i>M. smegmatis</i> pomiar gęstości optycznej (OD ₆₀₀) ..	59

4.28. Globalna analiza transkryptomu szczepów <i>M. smegmatis</i> oraz <i>M. tuberculosis</i>	59
4.29. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern blot	60
4.30. Immunodetekcja białek za pomocą Western blot	60
4.31. Konstrukcja mutantów CRISPR-Cas9.....	61
4.32. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym.....	62
4.33. Analiza wyników qRT-PCR metodą komparatywną	62
4.34. Przygotowywanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych <i>M. smegmatis</i> i <i>M. tuberculosis</i>	63
4.35. Konstrukcja plazmidów do komplementacji.....	64
5. Wyniki	65
5.1 Identyfikacja enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA w proteomie mykobakterii metodami <i>in silico</i>	65
5.2 Identyfikacja roli białka CCA _{Mtb} w komórkach mykobakterii	67
5.3 Globalna analiza transkryptomyczna mykobakterii z obniżonym poziomem ekspresji genu CCA _{Mtb}	70
5.4. Poszukiwanie enzymów o aktywności egzonukleolitycznej/	76
endonukleolitycznej zaangażowanych w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii	76
5.5. Ocena aktywności badanych enzymów <i>M. smegmatis</i> z nadrodziny DnaQ.....	90
5.6. Analiza transkryptomyczna mutantów nukleaz z nadrodziny DnaQ	102
6. Dyskusja	111
7. Wnioski	118
8. Streszczenie	119
9. Abstract	121
10. Literatura	123

Wykaz skrótów

AD – albumina/ glukoza/ chlorek sodu

Amp^R – oporność na ampicylinę

cDNA – komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)

CRISPR – zgrupowane, regularnie poprzedzielane, krótkie palindromiczne sekwencje powtórzone oraz powiązane z nimi białka (ang. *Clustered Regularly – Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins*)

DCO – podwójny krzyżowy rekombinant (ang. *double cross over recombinant*)

DEPC – pirowęglan dietylu

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)

DNaza – deoksyrybonukleaza

dNTP – mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów

HEX – heksachloro-fluoresceina

IPTG – izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd

Km^R – oporność na kanamycynę

MCS – sekwencja polilinkerowa (ang. *multi cloning site*)

ncRNA – kwas rybonukleinowy, który nie koduje białka lub peptydu (ang. *noncoding RNA*)

OADC – kwas oleinowy/albumina/dekstroza/katalaza

OD₆₀₀ – gęstość optyczna zawiesiny komórek bateryjnych badana z wykorzystaniem fali o długości $\lambda=600$ nm (ang. *optical density*)

PAN – Polska Akademia Nauk

PCR – łańcuchowa reakcja polimeryzacji (ang. *polymerase chain reaction*)

pz – liczba par zasad

qRT-PCR – ilościowy PCR z odwrotną transkryptazą

RIN – numer integralności RNA (ang. *RNA integrity number*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RNA-Seq – sekwencjonowanie RNA

RNaza – rybonukleaza

rpm – obroty na minutę (ang. *revolutions per minute*)

SCO – pojedynczy krzyżowy rekombinant (ang. *single cross over recombinant*)

SDS – siarczan dodecyłu sodu

SDS-PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

sRNA – małe RNA (ang. *small RNA*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina

UV – promieniowanie ultrafioletowe

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -galaktopiranozyd

1. Wstęp

1.1. Rodzaje RNA w komórce bakteryjnej

Kwasy rybonukleinowe (RNA) są polimerami kondensacyjnymi rybonukleotydów mającymi zróżnicowaną wielkość, strukturę i funkcje biologiczne. Podczas transkrypcji informacyjny RNA jest syntetyzowany na matrycy DNA przez polimerazę RNA. Następnie na matrycy RNA następuje synteza białka w rybosomach w procesie translacji (Babitzke i in., 2019; Shippy & Fadl, 2015; Šponer i in., 2018). Translacja to wieloetapowy proces angażujący szereg enzymów, aminokwasy oraz cząsteczki RNA w tym tRNA, mRNA i rRNA wchodzące w skład rybosomów. Duża liczba odkrytych do tej pory antybiotyków wpływa na zahamowanie translacji, co wskazuje na znaczenie tego procesu dla przeżycia komórek bakteryjnych ((Kavčič i in., 2020; Ravishankar i in., 2016). Ekspresja genów jest jednym z podstawowych procesów zachodzących we wszystkich komórkach. Ścieżkę, za pomocą której informacja z DNA jest kopiowana do RNA i tłumaczona na sekwencje aminokwasów w białkach, określa się jako „centralny dogmat biologii molekularnej” (Buskila i in., 2014; Felden & Augagneur, 2021).

W proces translacji zaangażowane są trzy główne typy RNA:

- informacyjny RNA (mRNA) stanowiący matrycę syntezy białka,
- rybosomalny RNA (rRNA) budujący rybosomy,
- transferowy RNA (tRNA) odpowiadający za transport aminokwasów do rybosomów (Shippy & Fadl, 2015).

Większość cząsteczek RNA u bakterii to rybosomalny RNA (rRNA). Transferowy RNA (tRNA) i inne niekodujące lub regulatorowe małe cząsteczki RNA (sRNA) występują w komórce w mniejszej ilości (Rombouts & Nollmann, 2021).

U *E. coli* cząsteczki RNA, kodujące białka, mają stosunkowo krótki, całkowity okres półtrwania chemicznego. Okres półtrwania mRNA u *Mycobacterium smegmatis* wynosi około 5 min. Nieco dłuższy okres półtrwania – 9,5 min – określono dla transkryptów *Mycobacterium tuberculosis* podczas logarytmicznej fazy wzrostu (Laalami i in., 2014). Poszczególne transkrypty mają czas półtrwania modulowany w zależności

od etapu wzrostu komórki i jej reakcji na stres. Na modulację czasu półtrwania transkryptu wpływają cząsteczki małego regulacyjnego RNA będące regulatorami potranskrypcyjnymi. Natomiast za degradację RNA odpowiadają enzymy o aktywności rybonukleaz (Bandyra & Luisi, 2013).

W degradacji RNA uczestniczą także same cząsteczki RNA, które mogą katalizować proces odtwarzania cząsteczek RNA (turn over). Wiele cząsteczek sRNA jest zaangażowanych w hamowanie procesu translacji indukując interakcje substratu z rybonukleazą. Niektóre sRNA indukują natomiast proces translacji poprzez odsłonięcie miejsca wiążącego rybosom (Bandyra & Luisi, 2013).

Część cząsteczek sRNA u bakterii transkrybowana jest z regionów między genowych. U wielu organizmów transkrypty kodujące tRNA są dodatkowo źródłem małych regulatorowych RNA, tak zwanych małych RNA pochodzących z tRNA (Coskun i in., 2021).

1.2. Funkcje małych RNA

Mały regulatorowy RNA sprawuje kontrolę potranskrypcyjną w wielu szlakach metabolicznych w komórce bakterii (Saliba i in., 2017). Niekodujące małe cząsteczki RNA (sRNA) wykryto u wszystkich dotychczas zbadanych gatunków bakterii (Bossi & Figueroa-Bossi, 2016).

U *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* i innych gatunków, większość sRNA to potranskrypcyjne regulatory głównych procesów biologicznych, w tym różnych reakcji stresowych, adaptacji do zmian związanych z dostępnością różnych składników odżywczych, *quorum sensing*, tworzenia biofilmu, ruchliwości i patogenezy (Bossi & Figueroa-Bossi, 2016; Sinha i in., 2018).

Bakterie są zaprogramowane tak, aby odbierać bodźce i skutecznie reagować na zmiany w swoim środowisku bytowania. Siła i charakter odpowiedzi są często podyktowane złożonymi sieciami regulacyjnymi zakodowanymi w genomie bakteryjnym. Sieci te przekształcają bodźce środowiskowe, takie jak obecność szkodliwych czynników środowiskowych lub zmiany w dostępności składników odżywczych, w precyzyjne, globalne zmiany w ekspresji genów. Dostosowanie się do

zmiennych warunków życia pozwala bakteriom uporać się z zagrożeniami chemicznymi i biologicznymi oraz efektywnie wykorzystać dostępne w środowisku zasoby energetyczne. Bakteryjne sRNA są szeroko rozpowszechnionymi i funkcjonalnie zróżnicowanymi regulatorami o wielkości 50 - 250 nukleotydów (Beisel & Storz, 2010; Wagner & Romby, 2015).

Mykobakteryjne sRNA mają różne rozmiary i struktury drugorzędowe. Tylko niewielka część sRNA została funkcjonalnie scharakteryzowana. Niektóre z nich są w dużej ilości obecne w zainfekowanych liniach komórkowych i u zakażonych pacjentów, sugerując udział sRNA w interakcjach na styku patogen – gospodarz (Coskun i in., 2021).

Najczęstszy mechanizm regulacji genów przez bakteryjne sRNA obejmuje tworzenie krótkich, często niedoskonałych sparowań z docelowymi mRNA, formując w ten sposób dupleks sRNA-mRNA, który zakłóca wiązanie podjednostki 30S rybosomu z miejscem wiązania rybosomu znajdującym się w regionie inicjacji translacji mRNA (Bossi & Figueroa-Bossi, 2016). Funkcje małego RNA u bakterii wymieniono w Tabeli 1.2.1.

Tabela 1.2.1. Funkcje sRNA u bakterii.

Funkcje sRNA u bakterii	
Funkcja	Opis
sRNA w systemie CRISPR Cas9	Nadają odporność adaptacyjną przeciwko inwazyjnym plazmidom, fagom, wirusom – crRNA, działają przez parowanie zasad i kierują białko Cas do docelowego DNA lub RNA w celu degradacji (Barrangou, 2013; Barrangou & Marraffini, 2014).
sRNA w regulacji białek transportujących	GcvB to konserwatywny sRNA posiadający dużą liczbą celów, na które oddziałuje. Częsteczką ta obniża poziom dwóch peryplazmatycznych białek wiążących transportery peptydowe: OppA i DppA (Urbanowski i in., 2000). U <i>E. coli</i>

	<p>oraz <i>Salmonella spp.</i> zidentyfikowano dwa dodatkowe cele tej cząsteczki sRNA – transportery aminokwasów oraz enzymy uczestniczące w metabolizmie aminokwasów (Sharma i in., 2007, 2011).</p>
<p>sRNA w ruchliwości i biofilmie</p>	<p>W zależności od dostępności składników odżywczych i innych czynników środowiskowych, niektóre bakterie stają się ruchliwe (produkują wici) lub osiadłe (tworząc wielokomórkowe społeczności – biofilmy). Złożona sieć transkrypcyjna wzajemnie reguluje te dwa typy bytowania poprzez wpływ na ich kluczowe regulatory. U enterobakterii kilka cząsteczek sRNA (w tym: OmrAB, McaS, RprA, GcvB, RydC) bezpośrednio i pośrednio zapobiega syntezie wici (Boehm & Vogel, 2012).</p>
<p>sRNA w kontrolowaniu ekspresji genów wirulencji</p>	<p>U patogennych bakterii różnorodność sRNA wiąże się z funkcjami regulacyjnymi ich metabolizmu i adaptacją do warunków stresowych. U <i>Enterococcus faecalis</i> i <i>Listeria monocytogenes</i> sRNA zawierający ryboprzełącznik witaminy B12 reguluje ekspresję genów poprzez sekwestrację regulatora odpowiedzi (DebRoy i in., 2014). Brak ww. regulacji osłabia zjadliwość <i>Listeria</i> u myszy (Mellin i in., 2014).</p>
<p>sRNA w systemach toksyna-antytoksyna</p>	<p>Toksyny są stabilnymi białkami, których ekspresja jest hamowana przez antytoksyny w postaci antysensownych mRNA (klasa I); są utrzymywane w stanie nieaktywnym przez białka antytoksyny (klasa II) lub są neutralizowane przez bezpośrednie wiązanie RNA dla antytoksyny (klasa III) ((Brantl & Jahn, 2015). TisB jest indukowaną w systemie SOS toksyną integrującą z membraną cytoplazmatyczną, która zatrzymuje wzrost komórek. W warunkach bezstresowych jej translacja jest hamowana przez cząsteczki sRNA – IstR1 (Darfeuille i in., 2007).</p>

Funkcje sRNA u mykobakterii	
Funkcja	Opis
Odpowiedź wewnątrzgenowych sRNA na stres	Poziom sRNA zmienia się w odpowiedzi na różne warunki stresu środowiskowego. Wykazano, że brak składników odżywczych (głodzenie) czy wejście w fazę stacjonarnego wzrostu zwiększają ekspresję licznych sRNA (Arnvig i in., 2011).
sRNA a stres oksydacyjny	sRNA takie jak: ncRv10243, ncRv10609A i ncRv13660c - wykazują zwiększoną ekspresję w odpowiedzi na H ₂ O ₂ , który imituje stres oksydacyjny napotykaną wewnątrz makrofagów gospodarza. Wymienione sRNA mogą być indukowane we wczesnych stadiach infekcji i mogą odgrywać rolę w pierwszych etapach adaptacji w komórkach gospodarza (Hartkoorn i in., 2012).
Niedotlenienie (hipoksja)	Głównym regulatorem odpowiedzi na stres związany z niedoborem tlenu u <i>M. tuberculosis</i> jest regulon DosR. Podczas przejścia z wykładniczej fazy wzrostu do fazy stacjonarnej następuje nagromadzenie wielu wewnątrzgenowych sRNA. Przejście to wiąże się z niedoborem składników odżywczych i tlenu. Częsteczki sRNA są akumulowane w komórce podczas infekcji, co sugeruje ich rolę w procesie adaptacji w organizmie gospodarza (przykładem takiego sRNA jest ncRv11733) (Arnvig i in., 2011).
sRNA a stres kwasowy	<i>M. tuberculosis</i> ma zdolność hamowania dojrzewania fagosomu. Odporność na stres indukowany pH środowiska odgrywa główną rolę w wewnątrzkomórkowym przeżywaniu prątków. Wiele cząsteczek sRNA <i>M. tuberculosis</i> jest indukowanych przez niskie pH środowiska (w tym cząsteczki ncRv10243) (Hartkoorn i in., 2012).

Ze względu na rozwój i doskonalenie metod sekwencjonowania (RNAseq), w ostatnich latach zidentyfikowano dużą liczbę cząsteczek sRNA. Charakterystyka ich funkcji w różnych sieciach regulacyjnych wymaga jednak dalszych badań (Oliva i in., 2015).

1.3. Niekodujący RNA (ncRNA) u Mykobakterii

Niekodujący RNA to dowolny transkrypt, który nie koduje białka lub peptydu. U bakterii obejmuje grupę dobrze zbadanych, stabilnych RNA o zdefiniowanych funkcjach komórkowych, tj. rRNA (rybosomalny RNA), tRNA (transferowy RNA), 4,5S RNA (składnik cząsteczki rozpoznającej sygnał SRP), RnpB (rybozym RNazy P) i transferowo-informacyjny RNA (tmRNA). Ponadto wyróżniamy regulatorowe RNA, które obejmują 5' i 3' regiony nie podlegające translacji (UTR) związane z sekwencjami kodującymi oraz transkrypty charakteryzujące się możliwością parowania zasad z mRNA lub współpracujące z białkami. Do tej ostatniej kategorii należą cząsteczki określane jako małe RNA (sRNA) (Arnvig i in., 2014).

1.4. Funkcja mikro RNA u bakterii

Jedną z grup sRNA są cząsteczki transkrybowane z regionów między genowych. Ta grupa sRNA jest nazywana transkodowanym RNA (Coskun i in., 2021). Transkodowany RNA uważany jest za najbardziej spokrewniony z eukariotycznymi mikro RNA i siRNA. Podobnie jak u Eukariota ten rodzaj sRNA jest w stanie regulować translację i stabilność docelowych mRNA. Transkodowane bakteryjne cząsteczki sRNA są zazwyczaj transkrybowane jako pojedyncze transkrypty, o długości około 100 nukleotydów. Prokariotyczne sRNA pochodzące z przetwarzania większych RNA są dłuższe niż typowe eukariotyczne mikroRNA i siRNA. W większości przypadków te cząsteczki sRNA, wiążą się z białkiem opiekuńczym Hfq, które stabilizuje sRNA i ułatwia jego parowanie zasad z docelowym mRNA. Parowanie zasad między prokariotycznymi transkodowanymi sRNA i mRNA zwykle prowadzi do degradacji mRNA, a także blokowania translacji. Z drugiej

strony, łączenie sRNA i mRNA może również skutkować stymulacją procesu translacji (Bloch i in., 2017).

1.5. Dojrzewanie niekodującego RNA

1.5.1. rRNA

Wszystkie funkcjonalne rRNA w bakteriiach gramoujemnych dojrzewają z dużych transkryptów policistronowych 30S rRNA. Zawierają one sekwencje kodujące dla 16S, 23S i 5S rRNA, a także co najmniej jeden tRNA i znaczną ilość sekwencji rozdzielających. Odwrócone powtórzenia prowadzą do powstania dwóch dużych struktur pętli macierzystej zawierających podjednostki 16S i 23S jako część dużych pętli. Wstępne cięcie przez RNazę III, enzym specyficzny dla dwuniciowego RNA, w dwuniciowych fragmentach uwalnia prekursor rRNA 17S (pre-16S), 25S (pre-23S) i 9S (pre-5S), a także wbudowane tRNA. Prekursor pre-16S, zawierający 115 dodatkowych nukleotydów na końcu 5', jest następnie przecinany endonukleolitycznie przez RNazę E, która usuwa 60 nukleotydów. W dalszej kolejności endonukleaza RNaza G usuwa pozostałe 55 nukleotydów, aby wygenerować dojrzały koniec 5' 16S rRNA. Dodatkowe 33 nukleotydy pozostałe na końcu 3' rRNA są usuwane przez endonukleazę YbeY lub kompleks RNazy II, RNazy PH, PNPazy i RNazy R. Z kolei, w Pre-5S nukleaza RNaza E usuwa po 3 nukleotydy z każdej strony dojrzałej sekwencji. Trzy dodatkowe nukleotydy na końcu 3' pre-5S rRNA są usuwane przez 3' → 5' egzonukleazę RNazę T (Mohanty & Kushner, 2018).

1.5.2. sRNA

Wszystkie sRNA zidentyfikowane do tej pory wymagają wstępnego przetwarzania przez RNazę E (Mohanty & Kushner, 2018). Jednakże nie można wykluczyć istnienia cząsteczek sRNA, które nie podlegają żadnym modyfikacjom, aby były funkcjonalne.

1.5.3. tRNA

Dojrzewanie 3' końca tRNA u bakterii jest skomplikowanym procesem. Bakteryjne tRNA są często kodowane przez operony policistronowe. Taki policistronowy transkrypt tRNA może zawierać więcej niż jeden tRNA lub dodatkowo rRNA i mRNA. Niektóre bakterie mają genetycznie zakodowane sekwencje CCA na 3' końcu dla wszystkich tRNA, podczas gdy inne kodują CCA tylko dla niewielkiej części tRNA. W obu przypadkach dodatkowe sekwencje obecne zarówno na końcach 5' jak i 3' tRNA są usuwane podczas dojrzewania tRNA (Braun & Condon, 2014; Li i in., 2005). Sekwencja CCA stanowi jednoniciowy motyw znajdujący się na 3' końcu wszystkich dojrzałych tRNA, do których przyłączony jest pokrewny aminokwas. U *B. subtilis* około jedna trzecia genów tRNA nie posiada motywu CCA. W tym przypadku CCA jest syntetyzowany po procesie transkrypcji przez enzym zwany tRNA nukleotydylotransferazą. Dodatkowe nukleotydy na 5' końcu są usuwane przez endorybonukleazę, RNazę P. Enzym ten jest rybozymem i składa się z dwóch niezbędnych podjednostek – katalitycznej podjednostki RNA i podjednostki białkowej. Dojrzewanie 3' końca tRNA może odbywać się głównie drogą egzonukleolityczną lub endonukleolityczną, co ma związek z obecnością lub brakiem motywu CCA w prekursorowym tRNA (Braun & Condon, 2014).

U *E. coli* wiele transkryptów jest zakończonych w sposób niezależny od białka Rho, co generuje pętlę (stem loop) na 3' końcu tRNA. Przetwarzanie większości tych transkryptów tRNA jest inicjowane przez RNazę E, która albo usuwa niezależne od Rho terminatory transkrypcyjne, albo przecina cząsteczkę w regionach intercystronowych. Niezależny od Rho terminator transkrypcji na pierwotnym transkrypcie *leuX* jest usuwany egzonukleolitycznie przez PNPazę (Mohanty & Kushner, 2010; Shepherd & Ibba, 2015). Wiele policistronowych transkryptów tRNA jest początkowo przecinanych przez RNazę P. U bakterii gramujemnych istnieje tylko jedna rybonukleaza, RNaza P, która generuje dojrzały koniec 5' wszystkich cząsteczek tRNA (Mohanty & Kushner, 2018).

Dojrzewanie 3' końca tRNA może być przeprowadzone przez różne egzonukleazy 3'→5', w tym RNazę T, RNazę PH, RNazę D, RNazę BN i RNazę II. PNPaza i RNaza II mogą

również usuwać dodatkowe nukleotydy z końca 3' pre-tRNA, ale nie mogą zakończyć ostatecznego procesu dojrzewania, aby odsłonić terminalną sekwencję CCA. Większość pre-tRNA (79 z 86) u *E. coli* wykorzystuje kombinację RNazy T i RNazy PH w procesie dojrzewania 3' końca. Inaktywacja zarówno RNazy T, jak i RNazy PH prowadzi do szybkiej akumulacji 3' niedojrzałych tRNA, które są poliadenylowane przez enzym PAPI i stanowią substrat dla degradosomu (Mohanty & Kushner, 2018).

Enzym PAP I dodaje krótkie powtórzenia poli (A) do niedojrzałych tRNA. Jednak większość poliadenylowanych tRNA, zamiast ulegać degradacji jako wadliwy tRNA, dojrzewa powoli dzięki aktywności egzonukleaz: RNaza D i RNaza BN lub Z. Enzym PAP I pomaga regulować funkcjonalny poziom tRNA u *E. coli*. Jednak nadmiar poliadenylowanych cząsteczek hamuje aminoacylację i syntezę białek, powodując szybką śmierć komórki (Mohanty & Kushner, 2018).

Mechanizm dojrzewania tRNA u *M. tuberculosis* nie został dotąd szczegółowo opisany. Genom *M. tuberculosis* koduje RNazę P, która bierze udział w początkowym przetwarzaniu 5' końca cząsteczek tRNA. Zestaw enzymów do obróbki końca 3' obejmuje RNazę PH, RNazę Z, RNazę D oraz funkcjonalny i strukturalny ortolog RNazy T. Wiele cząsteczek tRNA *Mycobacterium* potrzebuje dosyntetyzowania motywu CCA na 3'-końcu. Prawdopodobnie są one dodatkowo edytowane przez polimerazę poli(A) lub PNPazę (Coskun i in., 2021).

1.6. Kontrola jakości transkryptów tRNA

Monitorowanie integralności strukturalnej tRNA i natychmiastowe usuwanie niefunkcyjnych transkryptów z puli tRNA komórki zapewnia jej prawidłowe funkcjonowanie. Eliminacja uszkodzonych cząsteczek tRNA jest zwykle inicjowana przez dodanie specyficznej jednoniciowej sekwencji RNA, która służy jako znacznik degradacji i czyni tRNA dostępnym dla degradujących egzonukleaz. U bakterii są to krótkie trakty poli(A) dodane przez polimerazę poli(A). Te powtórzenia są zwykle rozpoznawane przez RNazę II, która ostatecznie przekazuje wadliwy tRNA do degradacji z udziałem

fosforylasy polinukleotydowej (PNPaza), której aktywność egzonukleazy 3'-5' katalizuje rozkład transkryptu (Płociński i in., 2019; Wellner, Czech, i in., 2018).

Znacznikiem dla procesu degradacji może być też synteza dodatkowej sekwencji CCA na 3' końcu tRNA przez tRNA nukleotydyloransferazę (CCA adding enzyme). Motyw CCACCA jest rozpoznawany jako znacznik degradacji a cząsteczki tRNA zawierające taką sekwencję nie podlegają dalszej obróbce przez egzonukleazy (Wellner, Betat, i in., 2018).

1.7. Polimeraza poli(A)

Poliadenylacja jest procesem enzymatycznym przeprowadzanym przez polimerazę poli(A) (PAPI) w celu dodania reszt adeninowych do 3' końca RNA. Powtórzenia poli(A) na końcu 3' mRNA były uważane przez długi czas za charakterystyczną cechę eukariotycznych mRNA, wpływając na stabilizację eukariotycznych mRNA i ich translację (Hajnsdorf & Kaberdin, 2018; Mohanty & Kushner, 2010). Poliadenylacja jest uniwersalną modyfikacją potranskrypcyjną, która wpływa na aktywność i los RNA (Régnier & Hajnsdorf, 2013). Po raz pierwszy prokariotyczna polimeraza poli(A) została odkryta u *E. coli* w 1962 roku. Od tego czasu procesowi poliadenylacji u bakterii poświęcano bardzo mało uwagi. W przeciwieństwie do Eukariota, prawdopodobnie tylko niewielka część bakteryjnych mRNA jest poliadenylowana w danym momencie. Przyjęto założenie, że poliadenylacja u Prokariota umożliwia szybszy rozpad nieprawidłowych transkryptów mRNA (Mohanty & Kushner, 2019). Enzym PAP I *E. coli* do swej aktywności wymaga dwuwartościowych jonów metali (Mg^{2+} lub Mn^{2+}) i wykorzystuje ATP jako substrat do dodawania reszt adenozyiny na końcu 3' cząsteczek RNA. Wewnątrzkomórkowy poziom PAP I u *E. coli* jest zwykle niski, ponieważ jego nadprodukcja jest szkodliwa dla wzrostu komórek (Yehudai-Resheff & Schuster, 2000).

Szacuje się, że aż 15–25% całkowitego RNA u *B. subtilis* jest poliadenylowany. Natomiast, u *E. coli* mniej niż 2% całkowitego RNA podlega poliadenylacji (Mohanty & Kushner, 2010).

U *E. coli* wszystkie typy RNA, do których zalicza się mRNA, dojrzały i prekursorowy tRNA i rRNA, a także mały regulacyjny, niekodujący RNA (sRNA) i wirusowy RNA, ulegają poliadenylacji przez polimerazę poli(A) (PAP I) (Régnier & Hajnsdorf, 2013). W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że PAP I może dobudowywać wszystkie rybonukleotydy, ale z mniejszą efektywnością niż rATP. Natomiast *in vivo* enzym ten syntetyzuje wyłącznie homopolimerowe powtórzenia poli(A) (Mohanty & Kushner, 2010).

W genomie *E. coli* zidentyfikowano geny kodujące trzy dodatkowe białka-PNPazę, RNazę PH i transferazę nukleotydylową tRNA, które wraz białkiem PAP I należą do tej samej nadrodziny nukleotydylotransferaz (Mohanty & Kushner, 2010). Przed identyfikacją funkcji biologicznej produktu genu *pcnB* u *E. coli* zauważono, że ma on wysokie podobieństwo sekwencji z nukleotydylotransferazą tRNA, enzymem katalizującym dodawanie reszt A i C do cząsteczek tRNA (Hajnsdorf & Kaberdin, 2018).

1.8. Nukleotydylotransferaza tRNA

Enzymy dodające motyw CCA występują u wszystkich żywych organizmów. Można je podzielić na dwie strukturalnie różne klasy polimeraz β . Enzymy Archea należą do klasy I, a ich eukariotyczne i bakteryjne odpowiedniki reprezentują enzymy klasy II. Oba typy enzymów różnią się ogólną strukturą i mechanizmem selekcji nukleotydów (Wellner, Betat, i in., 2018). U *E. coli* nukleotydylotransferaza tRNA składa się z dwóch domen: N-końcowej domeny o aktywności nukleotydylotransferazy i niescharakteryzowanej C-końcowej domeny HD. Motyw HD definiuje nadrodzinę fosfohydrolaz zależnych od metali (Yakunin i in., 2004).

U *E. coli* sekwencja CCA jest zakodowana we wszystkich genach tRNA. W związku z tym enzym dodający CCA nie jest wymagany do dojrzewania tRNA. Przyczynia się natomiast do odzyskiwania uszkodzonych końców CCA (Wellner, Czech, i in., 2018).

Nukleotydylotransferaza tRNA dodaje trzy nukleotydy w kolejności C, C i A do tRNA, wykorzystując rCTP i rATP jako substraty (Yakunin i in., 2004).

Enzym dodający sekwencję CCA działa jak „imadło molekularne” na związany substrat tRNA. Niestabilna cząsteczka tRNA (spowodowana niedopasowaniem lub brakiem modyfikacji zasad) jest „zgniatana” przez enzym i ponownie fałdowana w taki sposób, że dodany koniec CCA jest zintegrowany z akceptorowym ramieniem helisy. Dzięki temu enzym może dodać drugi motyw CCA (Kuhn i in., 2015). Enzym tRNA nukleotydylotransferaza dosyntetyzowując sekwencję CCA uczestniczy w kontroli jakości tRNA dzięki naprawie wadliwych transkryptów lub ich degradacji poprzez syntezę podwójnej sekwencji CCA (Wellner, Czech, i in., 2018).

1.9. Egzonukleazy

Aktywność egzorybonukleolityczna odgrywa istotną rolę zarówno w komórkach eukariotycznych jak i prokariotycznych. Na ilość poszczególnych cząsteczek RNA w komórce wpływa nie tylko zdolność do ich syntezy, ale także szybkość degradacji. Egzorybonukleazy są zaangażowane w wielu szlakach rozpadu RNA, tym samym w utrzymaniu prawidłowego poziomu transkryptów w komórce (Zuo i in., 2007).

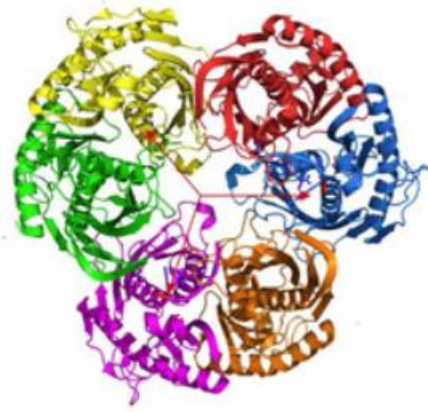
Egzonukleazy 3'→5' odgrywają regulacyjną rolę w rozpadzie RNA. Podczas syntezy transkryptów powstają nieprawidłowe cząsteczki RNA, które muszą zostać usunięte. Przetwarzanie 3' końca RNA jest jednym z etapów procesu dojrzewania zarówno mRNA jak i niekodujących cząsteczek RNA (Ibrahim i in., 2008). Wszystkie stabilne RNA są syntetyzowane jako prekursory. Dojrzewanie stabilnych RNA często wiąże się z początkowym cięciem przez endorybonukleazy, a następnie przycinaniem egzonukleolitycznym. U *E. coli* zidentyfikowano siedem odrębnych egzorybonukleaz, w tym RNaza D, RNaza PH, RNaza II i RNaza T (Zuo i in., 2007).

Cząsteczka RNA jest unikalnym substratem enzymatycznym, ponieważ każdy transkrypt jest inny, jednak musi być rozpoznawany przez ten sam zestaw enzymów. Poziom ekspresji genów dla niespecyficznego egzorybonukleaz musi być regulowany, aby zapobiec niekontrolowanemu rozpadowi wszystkich cząsteczek RNA. Specyficzne enzymy natomiast rozpoznają strukturę wtórną lub charakterystyczne motywy sekwencji na odpowiednich substratach RNA. Substraty dla 3' egzonukleaz obejmują

poliadenylowane cząsteczki RNA oraz wysoce ustrukturyzowane RNA, takie jak: tRNA i rRNA. W niektórych przypadkach egzonukleaza może działać samodzielnie w celu obróbki substratu, ale w większości przypadków do jej aktywności niezbędna jest obecność helikaza, czy kofaktora. W komórkach prokariotycznych aktywność egzonukleaz 3' jest równie ważna dla rozpadu mRNA (Ibrahim i in., 2008). Kompleks zwany degradosomem jest integralną częścią procesu degradacji RNA (TEJADA-ARRANZ i in., 2020). Degradosom składa się z endonukleazy (RNazy E), helikazy (RhlB), enolazy i egzoenzymu 3' (fosforylaza polinukleotydowej, PNPazy) (Ibrahim i in., 2008).

1.9.1. RNaza PH

Enzym RNaza PH (Rycina 1.9.1.) należy do rodziny egzonukleaz fosforolitycznych i jest zaangażowany w dojrzewanie małych stabilnych cząsteczek RNA. U Eukariota homologi RNazy PH tworzą heksameryczny rdzeń egzozomu, który odgrywa ważną rolę w degradacji mRNA i dojrzewaniu RNA. RNazę PH zidentyfikowano również w genomie *B. subtilis*, a szczepy pozbawione tego enzymu charakteryzuje nagromadzenie prekursorowych tRNA z zakodowanym motywem CCA. Prekursory takie zawierają od jednego do czterech nukleotydów więcej w porównaniu do dojrzałych cząsteczek. Świadczy to o szczególnej roli RNazy PH w usuwaniu ostatnich kilku nukleotydów obecnych na 3' końcach prekursorowych tRNA. Zaobserwowano, że mutanty pozbawione RNazy PH nadal są w stanie wytwarzać duże ilości dojrzałych cząsteczek tRNA zawierających sekwencję CCA, co sugeruje obecność w komórkach bakterii innego enzymu o podobnej aktywności (Braun & Condon, 2014). Takim enzymem u bakterii może być fosforylaza polinukleotydowa (PNPaza) stanowiąca komponent degradosomu, przetwarzająca tRNA przez fosforolizę (Yang, 2011).



Rycina 1.9.1. RNaza PH Archea i Eukariota. Formę funkcjonalną białka tworzy heksameryczny pierścień (Yang, 2011).

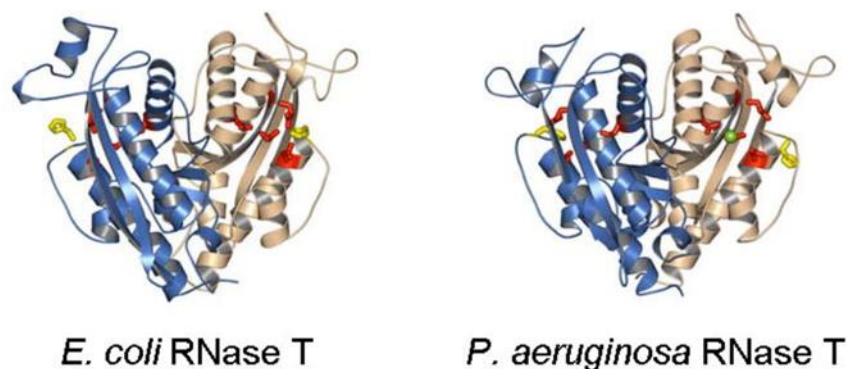
1.9.2. RNaza T

RNaza T (Rycina 1.9.2) różni się od innych egzonukleaz 3' tym, że ma zdolność rozpoznawania bardzo krótkich (1-2 nukleotydowych) jednoniciowych regionów. Dzięki swej aktywności, RNazaT może być enzymem przetwarzającym dla kilku małych stabilnych RNA u *E. coli* (Ibrahim i in., 2008). Enzym ten występuje w formie homodimeru zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* a tworzenie dimeru wydaje się być niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania (Zuo i in., 2007). RNaza T jest niezbędna do generowania dojrzałych 3' końców 5S i 23S rRNA. Enzym bierze również udział w "turn over" tRNA, który polega na usuwaniu i odtworzeniu końca CCA cząsteczki tRNA. W proces dojrzewania tRNA zaangażowany jest także konserwatywny enzym dodający terminalną sekwencję CCA, transferaza nukleotydylowa tRNA. Ortologi RNazy T zidentyfikowano tylko u niewielkiej grupy bakterii, należących do grupy y Proteobacterii (Zuo i in., 2007).

RNaza T należy do grupy DEDD, której nazwa nawiązuje do występowania czterech konserwatywnych reszt asparagianu i glutaminianu (Lovett, 2004). Podobnie jak wszystkie egzonukleazy DEDD, RNaza T jest egzonukleazą specyficzną dla pojedynczej nici i wymaga do swojej aktywności dwuwartościowych jonów metali, takich jak Mg^{2+} lub Mn^{2+} . RNaza T może się wiązać do sekwencji 10 nukleotydów, jednak jej specyficzność substratowa jest definiowana głównie przez ostatnie 4 reszty. RNaza T

okazuje się być jedynym enzymem zdolnym do skutecznego usuwania niepotrzebnych nukleotydów w pobliżu struktury dwuniciowej bez rozwijania podwójnej helisy. Działanie RNazy T znacznie zwalnia, gdy enzym zbliża się do dupleksu, jednak może trawić RNA do pierwszej pary zasad i generować dwuniciowy RNA (Zuo i in., 2007).

Ponadto, zaobserwowano że wyłącznie RNaza T jest enzymem, skutecznie usuwającym nukleotyd adeninowy z sekwencji CCA, pozostawiając tRNA z niekompletnym i niefunkcyjnym końcem 3'-CC, który jest następnie naprawiany przez enzym dodający motyw CCA (Wellner, Czech, i in., 2018).



Rycina 1.9.2. Struktura krystaliczna RNazy T *E. coli* i *P. aeruginosa* (Zuo i in., 2007).

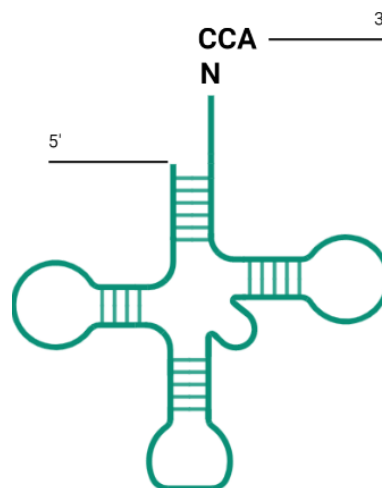
1.9.3. Rola RNazy T w kontroli jakości RNA

Cząsteczki tRNA z końcem CC, generowanym przez RNazę T są niefunkcyjne, ale mogą być przywracane przez enzym dodający sekwencję CCA. Wkład RNazy T w kontrolę jakości tRNA opiera się na jej specyficzności substratowej. Nieefektywne usuwanie reszt C zapewnia, że tRNA oznaczone CCACCA nie są dalej przetwarzane na dojrzałe transkrypty, które ponownie wchodzi do funkcjonalnej puli tRNA. Z uwagi na skuteczne usuwanie 3'-końcowej reszty A przez RNazę T, sekwencja CCACCA może być przekształcona w CCACC. Ten niefunkcyjny tRNA nie ulega natychmiastowej

degradacji i nie jest rozpoznawany przez syntetazę aminoacylo-tRNA, a pozostając nienaładowany i stanowi obojętny transkrypt tRNA. Nie dochodzi do akumulacji cząsteczek w komórce, z uwagi na obecność drugiego systemu nadzoru jakości tRNA, jakim jest polimeraza poli(A), która najprawdopodobniej wykorzystuje wspomnianą cząsteczkę tRNA jako substrat do syntezy ogona poli(A). W konsekwencji koniec 3' jest wystarczająco długi, aby został rozpoznany i uległ degradacji przez RNazy R. Dodawanie A, CCA lub CCACCA i degradacja nieustannie konkurują ze sobą, przebiegając równolegle na puli substratów tRNA w komórce (Wellner, Czech, i in., 2018).

1.9.4. RNaza Z

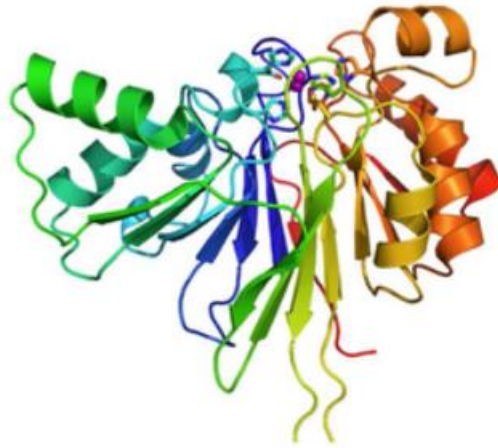
Enzym RNaza Z (Rycina 1.9.4.1.) należy do rodziny metalo- β -laktamaz zależnych od cynku. U *B. subtilis* przecina endonukleolitycznie prekursor tRNA, które pozbawione są motywu CCA. Enzym zazwyczaj tnie prekursor tRNA bezpośrednio za nukleotydem dyskryminacyjnym (niesparowanym) na końcu 3' trzonu akceptorowego (Rycina 1.9.4).



Rycina 1.9.4. Nukleotyd dyskryminacyjny oznaczony jako N na schemacie cząsteczki tRNA.

Aktywność RNazy Z jest dodatkowo stymulowana przez obecność reszty uracylowej występującej bezpośrednio za miejscem cięcia tRNA. Podobnie jak pozostałe rybonukleazy z rodziny β -laktamaz, RNaza Z ma aktywność endo i egzonukleazy (Braun & Condon, 2014). U *E. coli*, sekwencja CCA występuje na wszystkich prekursorach tRNA

zatem egzonukleolityczne cięcie generuje dojrzałe tRNA. Funkcja RNazy Z wydaje się z tego powodu zbędna u *E. coli*. Homologiem RNazy Z u *E. coli* jest RNaza BN. Delecja genu kodującego RNazę BN nie ma znaczącego wpływu na wzrost komórek (Dutta i in., 2012).

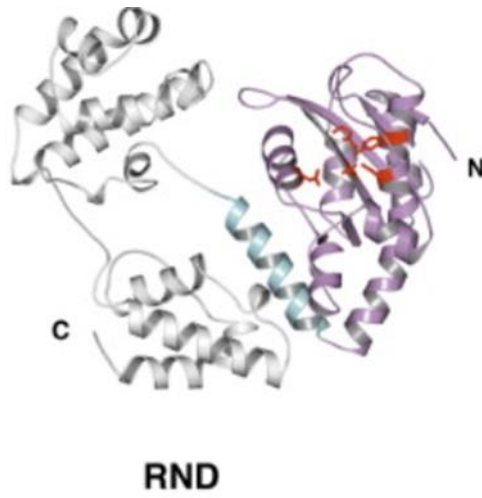


Rycina 1.9.4.1. Ogólna struktura RNazy Z (Yang, 2011).

1.9.5. RNaza D

Egzonukleaza – RNaza D (Rycina 1.9.5.), jest jedną z siedmiu samodzielnych egzorybonukleaz, które zostały zidentyfikowane u *E. coli*. Enzym uczestniczy w dojrzewaniu tRNA, 5S rRNA i kilku innych małych strukturalnych RNA. Szczepy *E. coli* pozbawione funkcjonalnej RNazy D hodowane na podłożach mikrobiologicznych nie wykazują osłabionego wzrostu w porównaniu do szczepu kontrolnego. Jednakże enzym ten jest niezbędny do prawidłowego wzrostu bakterii po usunięciu z komórki pozostałych nukleaz: RNazy II, BN, T i PH. Może sugerować to rolę RNazy D jako enzymu zapasowego, zastępującego funkcję pozostałych brakujących nukleaz. W warunkach *in vitro* RNaza D jest aktywna wobec substratów podobnych do tRNA, nie wykazując aktywności wobec homopolimerów RNA. Najbardziej preferowanymi substratami dla RNazy D są cząsteczki tRNA zawierające dodatkowe reszty na końcu 3' lub cząsteczki pozbawione w całości sekwencji CCA lub jej części. RNaza D jest egzorybonukleazą hydrolityczną działającą w kierunku od 3' do 5' końca. Enzym należy do nadrodziny DEDD. Nadrodzina DEDD zawiera zarówno egzonukleazy DNA, jak i RNA. Bliskie

homologi RNazy D *E. coli* zidentyfikowano w wielu genomach bakteryjnych, w tym u Proteobacteria (α , δ i γ podziałach) oraz prątków (Zuo i in., 2005).



Rycina 1.9.5. Struktura RNazy D *E. coli* (Zuo i in., 2005).

2. Cel pracy

Głównym celem niniejszej pracy była identyfikacja oraz charakterystyka enzymów uczestniczących w procesie dojrzewania 3' końca cząsteczek tRNA u mykobakterii.

Cel ten zrealizowano poprzez następujące cele cząstkowe:

1. Konstrukcję mutantów *M. tuberculosis* oraz *M. smegmatis* z obniżonym poziomem białka Rv3907c oraz Rv2783c z zastosowaniem technologii CRISPR/Cas9.
2. Globalną analizę transkryptomiczną mutantów CRISPR/Cas9 z obniżonym poziomem ekspresji genów *rv3907c* oraz *rv2783c*.
3. Konstrukcję mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnej kopii genów kodujących odpowiednio: RNazę PH, RNazę T, RNazę D, RNazę Z1 i RNazę Z2 oraz mutantów wielokrotnych (pozbawionych dwóch, trzech i czterech egzonukleaz rodziny DnaQ).
4. Konstrukcję mutantów *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem ekspresji RNaz PH i T przy użyciu systemu CRISPR Cas9.
5. Globalną analizę transkryptomów wybranych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych egzonukleaz nadrodziny DnaQ.
6. Zbadanie aktywności enzymatycznej egzonukleaz DnaQ wobec wybranych substratów RNA i DNA.

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Tabela 3.1.1 Wykaz szczepów bakteryjnych wykorzystywanych w pracy:

Nazwa szczepu	Źródło
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	IBM PAN Łódź
<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	IBM PAN Łódź
<i>E. coli</i> Top 10	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE 3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE 3) pLysS	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta	Invitrogen

Tabela 3.1.2. Wykaz genów kodujących białka nadrodziny DnaQ:

Nazwa genu <i>M. smegmatis</i>	Nazwa genu <i>M. tuberculosis</i>	Produkt	Nazwa skrótowa
<i>msmeg_4901</i>	<i>rv1340</i>	Rybonukleaza PH	<i>rnPH</i>
<i>msmeg_4245</i>	<i>rv2179c</i>	Rybonukleaza T	<i>rnT</i>
<i>msmeg_1776</i>	-	Rybonukleaza Z1	<i>rnZ1</i>
<i>msmeg_4568</i>	<i>rv2407</i>	Rybonukleaza Z2	<i>rnZ2</i>
<i>msmeg_2778</i>	<i>rv2681</i>	Rybonukleaza D	<i>rnD</i>

3.2. Podłoża mikrobiologiczne

Podczas realizacji badań wykorzystywano płynne i stałe podłoża do hodowli drobnoustrojów.

Podłoże LB płynne, pH 7

- NaCl (Sigma) - 1%
- Trypton (BioShop) - 1%
- Ekstrakt drożdżowy (Difco) - 0,5%

Podłoże LB stałe, pH7

- NaCl (Sigma) - 1%
- Trypton (BioShop) - 1%
- Ekstrakt drożdżowy (Difco) - 0,5%

Agar (Bioshop) – 2%

7H9 – podłoże płynne Middlebrook, pH 7

- 7H9 (Difco) - 0,47%
- Tween 80 (Sigma) – 0,05 %
- OADC (Becton Dickinson) - 10%

7H10 – podłoże stałe Middlebrook, pH 7

- 7H10 (Difco) - 1,9%
- Glicerol (Sigma) - 0,5%
- OADC (Becton Dickinson) - 10%

Podłoże minimalne z glicerolem

- 7H9 (Difco)
- Glicerol – 0,1%

Podłoże minimalne z cholesterolem

- 7H9 (Difco)
- Cholesterol – 0,01%

3.3. Substancje dodawane do podłoży

Antybiotyki	<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium</i>
Ampicylina	100 µg/mL	-
Higromycyna B	200 µg/ml	50 µg/ml
Kanamycyna	50 µg/mL	25 µg/mL
Anhydrotetracyklina	-	100 ng/mL
Gentamycyna	10 µg/mL	-
Chloramfenikol	34 µg/mL	-

Inne substancje

- X-gal 40 µg/mL
- IPTG 12 µg/ml
- Sacharoza 2%

3.4. Syntetyczne oligonukleotydy DNA wykorzystane w pracy

Tabela. 3.4. Lista oligonukleotydów wykorzystanych do amplifikacji DNA

Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji fragmentów DNA w celu przygotowania mutantów delecyjnych		
Nazwa	Sekwencja nukleotydowa 5'→3'	Wykorzystanie
RNaseDGR1-Scal-s	cagtactCATGGCGCCGAGCGCCGAGCAGT TCG	Delecja genu <i>rnD_{Ms}</i>
RNaseDGR2-HindIII-r	caagcttGTCGGCGCTGACGCAGAGTTC	
RnaseDGR3-HindIII-s	caagcttGCAGGGCAAGACCGAATGGGC	
RnaseDGR4-KpnI-r	cggtagcGACGAAGTCGGGCAGACGCTC	
Ms4901GR1Scal-2s	cagtagcTACCAGGACGCGTTCGCCG	Delecja genu <i>rnPH_{Ms}</i>
Ms4901GR2HindIII-2r	caagcttAGGTGAAGCCGCGGGTGATC	
Ms4901GR3HindIII-s	caagcttTGCGATGTGCTGCAGGCCG	
Ms4901GR4KpnI-r	cggtagcCGACGACGACGATCCGGCAC	
Ms4245GR1Scal-s	cagtactGATCGCCGAACTCGCCAGC	Delecja genu <i>rnT_{Ms}</i>
Ms4245GR2HindIII-r	caagcttCGACGCCGATCGAGATCAGG	
Ms4245GR3HindIII-s	caagcttATCGAGCTGTGGCCCTGGGT	
Ms4245GR4KpnI-r	cggtagcGCAGCAACATCGCCACCCTG	
Ms1776GR1-BamHI-s	cggatccTGTTCTGTCAGCATCGTGGTGGG	

Ms1776GR2-HindIII-r	caagcttAACCTCGTTGTCCAGCGCA	Delecja genu <i>rnZ1_{Ms}</i>
Ms1776GR3-HindIII-s	caagcttGCGCCGGCTCGATCATTCC	
Ms1776GR4-PstI-nat-r	AAGCGCAAGGCCCTGCAGTG	
Ms4568GR1-NotI-s	cgggccGCACAGGCAGGTCATGATGGGG	Delecja genu <i>rnZ2_{Ms}</i>
Ms4568GR2-HindIII	CaagcttGACGAGGAACGTCTGCCCGCT	
Ms4568GR3-HindIII-s	CaagcttGACGATCGCCTCCGTGTCGAG	
Ms4568GR4-Scal-nat-r	GCGTTGGCGCAGCAGTACTTCC	
Oligonukleotydy wykorzystane do potwierdzenia genotypu mutantów metodą hybrydyzacji Southern blot		
Msmeg_Z1-probe-s	GACACCCGGTTGTGCGACGC	Sonda dla potwierdzenia mutantów <i>rnZ1_{Ms}</i>
Msmeg_Z1-probe-r	CGTGGTAAACCTCGGCCGCC	
Msmeg_Z2-probe-s	GCACTCGACGCCCTGGCCA	Sonda dla potwierdzenia mutantów <i>rnZ2_{Ms}</i>
Msmeg_Z2-probe-r	TCGCCACTGGTCTCGGTGC	
Msmeg4901-BglII-s	cagatctGTGTCCAGACGAGAAGACGGGC	Sonda dla potwierdzenia mutantów <i>rnPH_{Ms}</i>
Msmeg4901-XbaI-r	ctctagattAGCTTCCGAACGCCTTTTTCG	
Msmeg4245-BamHI-s	cggatccATGCGGTA CTCTACGACACCGAG	Sonda dla potwierdzenia mutantów <i>rnT_{Ms}</i>
Msmeg4245-XbaI-r	ctctagattATGGTAACTGCCGGTAAAGCGC	
pHIS-RnaseD-NcoI-s	gccatggatACCCAAGGGGATACCGAACCTGC	Sonda dla potwierdzenia mutantów <i>rnD_{Ms}</i>
pHIS-RnaseD-HindIII-r	caagctTCAGTTCTCGGCCAGCGCGA	
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji genów do komplementacji mutantów		
MstI-like-prom-XbaI-s	CTCTAGAGCTACACGAAACGACCCCGCA	Komplementacja genu <i>rnT_{Ms}</i>
MstI-like-prom-HindIII-r	CAAGCTTCACCCGTTTCATGGTAACTGCCG	
MsRNaseZ1-prom-XbaI-s	CTCTAGAACAACAGGATCAGCGCGGG	Komplementacja genu <i>rnZ1_{Ms}</i>
MsRNaseZ1-prom-HindIII-r	CAAGCTTCTACGACGAGCGGTGTCCAACG	
Oligonukleotydy wykorzystane do potwierdzenia integracji rekombinowanych wektorów pMV306		
MV306-F	GTGGATAACCGTATTACCGC	Potwierdzenie integracji wektora pMV306Km z genem <i>T_{Ms}</i> i pMV306Km z genem <i>Z1_{Ms}</i>
MV306-R	AAGGCCAGTCTTTCGACTGAG	Potwierdzenie integracji wektora pMV306Km z genem <i>T_{Ms}</i> i pMV306Km z genem <i>Z1_{Ms}</i>
Oligonukleotydy wykorzystane do amplifikacji genów do nadprodukcji białek – Sekwencja oligonukleotydów 5'→3'		
Rv1340BglII-s	cagatctgGTGTCCAAGCGAGAAGACGGCC	

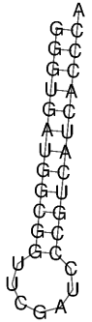
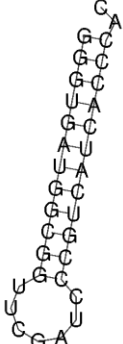
Rv1340HindIII-r	CaagcttTCAGGTGCCAAACGCCTTCGG	Nadprodukcja białka RNazy PH
pHIS-RnaseD-NcoI-s	gccatggatACCCAAGGGGATACCGAACCTGC	Nadprodukcja białka RNazy D
pHIS-RnaseD-HindIII-r	caagctTCAGTTCTCGGCCAGCGCA	
MsRNaseZ2-BamHI-s	cggatccgATGATCGAGGTCACCTGCTCGG	Nadprodukcja białka RNazy Z2
MsRNaseZ2-HindIII-r	CaagctTCACCCGGCTGGCTTGACGC	
Oligonukleotydy wykorzystywane do przygotowania mutantów w systemie CRISPR Cas9 - Sekwencja oligonukleotydów 5'→3'		
RvCasRNasePH-84-f	gggaAGCGGCTGTGGGTGGCCGACG	Konstrukcja szczepu <i>M. tuberculosis</i> z obniżonym poziomem białka PH
RvCasRNasePH-84-r	aaacCGTCGCCACCCACAGCCGCT	
RvCasRNaseTlike-84-f	gggaATCCTCGATGAATTCGGTGTC	Konstrukcja szczepu <i>M. tuberculosis</i> z obniżonym poziomem białka T
RvCasRNaseTlike-84-r	aaacGACACCGAATTCATCGAGGAT	
MtbCasMtrA84-for	gggaAGCCTTCCCCCGCAGCACGATGG	Konstrukcja szczepu <i>M. tuberculosis</i> z obniżonym poziomem białka CCA
MtbCasMtrA84-rev	aaacCCATCGTGCTGCGGGGGGAAGGCT	
MtbCasPNP-for	gggaGCTCCTCGACGTCGACCGTGAGGGG	Konstrukcja szczepu <i>M. tuberculosis</i> z obniżonym poziomem białka PNP
MtbCasPNP-rev	aaacCCCCTCACGGTCGACGTCGAGGAGC	
Oligonukleotydy użyte do analizy ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR) – Sekwencja oligonukleotydów 5'→3'		
RvsigA-F	CCTACGCTACGTGGTGGATTCCG	Amplifikacja genu <i>sigA</i> o konstytutywnej ekspresji w komórkach <i>M. tuberculosis</i>
RvsigA-R	TGGATTCCAGCACCTTCTCCG	
MssigA-F	CCAAGGGCTACAAGTTCTCG	Amplifikacja genu <i>siaA</i> o konstytutywnej ekspresji w komórkach <i>M. smegmatis</i>
MssigA-R	TGGATCTCCAGCACCTTCTC	
RvpcnART-s	GGTAGACCAGCTGCGAGATGTCGT	Oligonukleotydy wykorzystywane do oceny
RvpcnART-r	TGCTGCACGACATCGGCAAG	

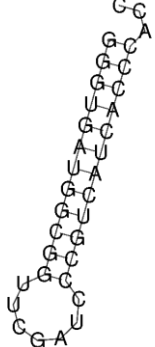
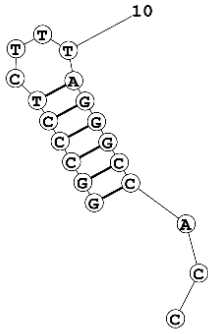
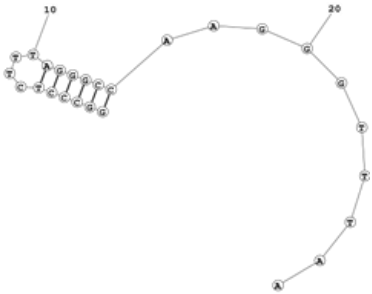
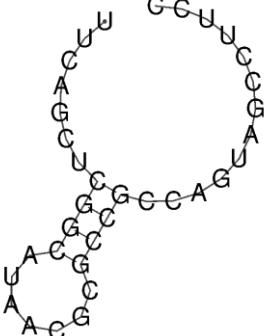
		poziomu ekspresji genu <i>pcnA</i> u <i>M. tuberculosis</i>
Ms-pcnA-RT-s	ATCTTGGCGCCCACCACCTC	Oligonukleotydy wykorzystywane do oceny poziomu ekspresji genu <i>pcnA</i> u <i>M. smegmatis</i>
Ms-pcnA-RT-r	TCGAGGACGACGGTCCGGA	

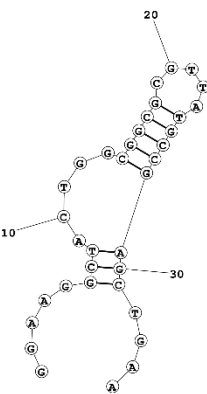
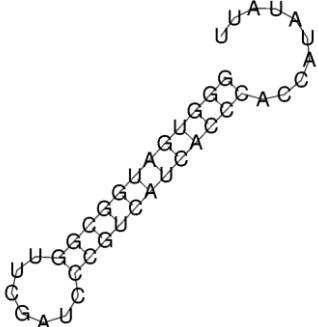
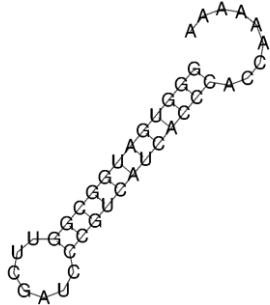
Tabela. 3.4.1. Lista oligonukleotydów wykorzystanych do hybrydyzacji typu Northern blot.

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa 5'→3'
RvtRNA-Asn-GTT	AACGCTCTGCCAATTGAGCTACAG
Rv-MstRNA-ProGGG	GAACCTGCGACCACTTGACCC
5s	GTATCATCGGCGCTGGCAGG

Tabela. 3.4.2. Lista oligonukleotydów wykorzystanych do badania oddziaływań białek z sekwencjami RNA i DNA.

Nazwa	Sekwencja nukleotydowa 5'→3'	Schemat cząsteczki
tRNA_0	[HEX]GGGUGAUGGCGGUUCGAU CCCGUCAUCACCCA	
tRNA_C	[HEX]GGGUGAUGGCGGUUCGAU CCCGUCAUCACCCAC	

tRNA_CC	[HEX]GGGUGAUGGCGGUUCGAU CCCGUCAUCACCCACC	
Stem loop DNA ACC	[HEX]GGCCCTCTTTAGGGCCACC	
Stem-loop DNA-10	[HEX]GGCCCTCTTTAGGGCCAAG GGTTTAA	
EMSA2c- RNA	[Cyanine5]UUCAGCUCGGCAUAA CGCGCCGCCAGUAGCCUUCC	

EMSA1	[HEX]GGAAGGCTACTGGCGGCGC GTTATGCCGAGCTGAA	
tRNA_7AU	[HEX]GGGUGAUGGCGGUUCGAU CCCGUCAUCACCCACCAUAUAUU	
tRNA_6A	[HEX]GGGUGAUGGCGGUUCGAU CCCGUCAUCACCCACCAAAAAA	

3.5. Wektory plazmidowe

pJET 1.2/bunt – uniwersalny wektor służący do klonowania produktów amplifikacji (PCR). Zawiera geny: *rep*, odpowiedzialny za replikację plazmidu; *bla* – warunkuje oporność na ampicylinę (Amp^R) oraz samobójczy gen *eco47IR* – koduje endonukleazę Eco47IR, w obrębie niego występuje sekwencja polilinkerowa (MCS – *multi cloning site*).

p2NIL – wektor niereplikujący się u mykobakterii, rekombinacyjny. Zawiera obszar *oriE*, który umożliwia replikację w komórkach *E. coli*, gen *aph* – kodujący fosfotransferazę aminoglikozydową (warunkuje oporność na kanamycynę), miejsce wielokrotnego klonowania MCS oraz sekwencję nukleotydową rozpoznawaną przez enzym PacI.

pGOAL17 - wektor zawierający obszar *oriE* pozwalający na replikację w komórkach *E. coli* oraz gen *bla* kodujący β -laktamazę – nadaje oporność na ampicylinę. Na kasecie markerowej znajduje się gen *sacB* (samobójczy) kodujący lewanosacharazę oraz gen *lacZ* – β -galaktozydazę. β -galaktozydaza rozkłada bezbarwny X-gal do niebieskiej pochodnej.

pLJR965 –wektor wykorzystywany do wyciszania ekspresji docelowego genu u *M. tuberculosis* metodą CRISPR/Cas9, niosący gen *KanR* warunkujący oporność na kanamycynę, *sth1*- kodujący inaktywowane białko Cas9 (dCas9), *tetR*- kodujący białko represora tetracykliny oraz *int*-kodujący integrację.

pLJR962 – wektor wykorzystywany do wyciszania ekspresji docelowego genu u *M. smegmatis* metodą CRISPR/Cas9, niosący gen *KanR* warunkujący oporność na kanamycynę, *sth1*- kodujący inaktywowane białko Cas9 (dCas9), *tetR*- kodujący białko represora tetracykliny oraz *int*, kodujący integrację.

pHIS-parallel1 – wektor ekspresyjny, posiadający indukowalny za pomocą IPTG promotor PT7, umożliwiający nadprodukcję rekombinowanych białek w fuzji z etykietą histydynową (6xHis) w komórkach *E. coli* oraz gen *AmpR* warunkujący oporność na ampicylinę.

pET28a – wektor ekspresyjny, który umożliwia nadprodukcję rekombinowanego białka w fuzji z histydynową etykietą (His), noszący gen *lacI* kodujący białko represorowe; *aph*, warunkujący oporność na kanamycynę. Ekspresja wklonowanego w miejsce MCS genu odbywa się z promotora PT7 indukowanego IPTG.

pMV306Km – wektor integracyjny zawierający system miejscowo-specyficznej rekombinacji mykobakteriofaga L5.

3.6. Wektory plazmidowe skonstruowane w IBM PAN Łódź w ramach realizacji pracy doktorskiej

Tabela 3.6.1. Wektory plazmidowe do konstrukcji mutantów *M. smegmatis*

Nazwa	Charakterystyka
pEL1	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnT_{Ms}</i> o wielkości 1373 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL2	Fragment 5' oraz sekwencje powyżej genu <i>rnT_{Ms}</i> o wielkości 1707 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL3	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnT_{Ms}</i> o wielkości 1373 pz, wklonowany do wektora p2NIL, Kan ^R
pEL4	Wektor p2NIL noszący delecje genu <i>rnT_{Ms}</i> wraz z regionami flankującymi, Kan ^R
pEL5	Wektor pEL4 niosący kasetę markerową ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym PacI z wektora pGOAL17, Kan ^R
pEL6	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnPH_{Ms}</i> o wielkości 1265 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL7	Fragment 5' oraz sekwencje powyżej genu <i>rnPH_{Ms}</i> o wielkości 1458 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL8	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>PH_{Ms}</i> o wielkości 1265 pz, wklonowany do wektora P2NIL, Kan ^R
pEL9	Wektor p2NIL noszący delecje genu <i>PH_{Ms}</i> wraz z regionami flankującymi, Kan ^R
pEL10	Wektor pEL9 niosący kasetę gentamycynową
pEL11	Wektor pEL10 niosący kasetę markerową z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym PacI, Kan ^R
pEL12	Fragment 3' oraz sekwencja poniżej genu <i>rnD_{Ms}</i> o wielkości 1572 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL13	Fragment 5' oraz sekwencja powyżej genu <i>rnD_{Ms}</i> o wielkości 1657 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R

pEL14	Fragment 3' oraz sekwencja poniżej genu <i>rnD_{Ms}</i> o wielkości 1572 pz, wklonowany do wektora p2NIL, Kan ^R
pEL15	Wektor p2NIL noszący delecję genu <i>rnD_{Ms}</i> wraz z regionami flankującymi, Kan ^R
pEL16	Wektor pEL15 niosący kasetę markerową z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym Pacl, Kan ^R
pEL17	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnZ1_{Ms}</i> o wielkości 1550 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL18	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnZ1_{Ms}</i> o wielkości 1550 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL19	Fragment 3' oraz sekwencje poniżej genu <i>rnZ1_{Ms}</i> o wielkości 1661 pz, wklonowany do wektora p2NIL, Kan ^R
pEL20	Wektor p2NIL noszący delecję genu <i>rnZ1_{Ms}</i> wraz z regionami flankującymi, Kan ^R
pEL21	Wektor pEL20 niosący kasetę markerową z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym Pacl, Kan ^R
pEL22	Fragment 3' wraz z sekwencją poniżej genu <i>rnZ2_{Ms}</i> o wielkości 1752 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL23	Fragment 5' oraz sekwencja powyżej genu <i>rnZ2_{Ms}</i> o wielkości 1307 pz, wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL24	Fragment 3' oraz sekwencja poniżej genu <i>rnZ2_{Ms}</i> o wielkości 1752 pz, wklonowany do wektora P2NIL, Kan ^R
pEL25	Wektor p2NIL niosący delecję genu <i>rnZ2_{Ms}</i> wraz z regionami flankującymi 3' i 5', Kan ^R
pEL26	Wektor pEL25 niosący kasetę markerową z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawalnymi przez enzym Pacl, Kan ^R
pEL27	Wektor noszący fragment DNA kodujący gen <i>rnT_{Ms}</i> o wielkości 767 pz wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL28	Gen <i>rnT_{Ms}</i> o wielkości 767 pz wklonowany do wektora pMV306 Kan ^R
pEL29	Gen <i>Z1_{Ms}</i> o wielkości 1180 pz wklonowany do wektora pJET 1.2/blunt, Amp ^R
pEL30	Gen <i>Z1_{Ms}</i> o wielkości 1180 pz wklonowany do wektora pMV306 Kan ^R

3.6.2. Wektory plazmidowe do wyciszenia ekspresji genów *M.tuberculosis* z wykorzystaniem systemu CRISPR Cas9

pEL31	Wektor pJET 1.2/blunt noszący fragment medium PAM 84,6x NNAGCAT dla wyciszenia ekspresji genu <i>T_{Mtb}</i> Amp ^R
pEL32	Wektor pLJR962 niosący sekwencje medium PAM 84,6x NNAGCAT <i>T_{Mtb}</i> Kan ^R
pEL33	Wektor pJET 1.2/blunt noszący fragment medium PAM 84,6x NNAGCAT dla wyciszenia ekspresji genu <i>PH_{Mtb}</i> , Amp ^R
pEL34	Wektor pLJR962 niosący sekwencję medium PAM 84,6x NNAGCAT <i>PH_{Mtb}</i> Kan ^R
pEL35	Wektor pJE 1.2/blunt noszący fragment medium PAM 84,6x NNAGCAT dla wyciszenia ekspresji genu <i>cca_{Mtb}</i> o wielkości 700 pz, Amp ^R
pEL36	Wektor pLJR962 niosący sekwencję medium PAM 84,6x NNAGCAT dla <i>cca_{Mtb}</i> Kan ^R
pEL37	Wektor pJET 1.2/blunt noszący fragment medium PAM 84,6x NNAGCAT dla wyciszenia ekspresji genu <i>gpsI_{Mtb}</i> o wielkości 700 pz, Amp ^R
pEL38	wektor pLJR962 niosący sekwencję medium PAM 84,6x NNAGCAT dla <i>gpsI_{Mtb}</i> Kan ^R

3.6.3. Wektory użyte do konstrukcji mutantów *E. coli* nadprodukujących rekombinowane białka

pEL39	wektor pJET 1.2/ blunt z fragmentem DNA kodującym gen <i>PH_{Mtb}</i> o wielkości 780 pz, Amp ^R
pEL40	wektor ekspresyjny pHIS z wklonowanym genem <i>PH_{Mtb}</i> o wielkości 780 pz
pEL41	wektor pJET 1.2/ blunt z fragmentem DNA kodującym gen <i>rnD_{Ms}</i> o wielkości 1248 pz, Amp ^R
pEL42	wektor ekspresyjny pHIS z wklonowanym genem <i>rnD_{Ms}</i> o wielkości 1248 pz
pEL43	wektor pJET 1.2/ blunt z fragmentem DNA kodującym gen <i>rnZ2_{Ms}</i> o wielkości 861 pz, Amp ^R
pEL44	wektor ekspresyjny pHIS z wklonowanym genem <i>rnZ2_{Ms}</i> o wielkości 861 pz

3.7. Enzymy

- amplifikacja DNA

Polimeraza DNA AccuPrime Pfx (Invitrogen)

Polimeraza DNA KAPA Taq (KAPA BIOSYSTEMS)

- łączenie fragmentów DNA

Ligaza T4 (Fermentas)

-usuwanie zanieczyszczeń DNA z próbek RNA

TURBO DNA-free™ Kit (Ambion)

-usuwanie zanieczyszczeń RNA z próbek DNA

RNaza (Sigma-Aldrich)

enzymy restrykcyjne FastDigest™ (Fermentas) do trawienia DNA

BamHI - *Bacillus amyloliquefaciens* H

BglII - *Bacillus globigii*

Esp3I (BsmBI) - *Bacillus stearothermophilus*

HindIII - *Haemophilus influenzae* Rd

KpnI - *Klebsiella pneumoniae* OK8

NcoI – *Nocardia coralina*

NotI - *Nocardia otitidis-caviarum*

Pacl - *Pseudomonas alcaligenes*

PstI - *Providencia stuartii*

Scal - *Streptomyces caespitosus*

SmaI - *Serratia marcescens*

XbaI - *Xanthomonas badrii*

3.8. Mieszaniny reakcyjne

Amplifikacja DNA

Amplifikację DNA przeprowadzano w objętości 50 µl z wykorzystaniem polimerazy DNA oraz buforu 10x stężonego, dołączonego do zestawu. Reakcję rozpoczynała denaturacja w temperaturze 95°C przez 2 minuty. Następnie reakcja była prowadzona przez 35 cykli:

- Denaturacja – w temperaturze 95°C przez 30 sekund
- Przyłączanie starterów – w temperaturze zależnej od użytych oligonukleotydów przez 45 sekund
- Elongacja – w temperaturze 68°C lub 72°C (w zależności od polimerazy) przez 60 sekund (na każde 1000 pz)

Następnie prowadzono ostatnią elongację w temperaturze 68°C przez 15 minut. Po tym etapie próbki schładzano do temperatury 4°C.

Łączenie fragmentów DNA przy użyciu ligazy T4

Łączenie fragmentów DNA prowadzono w objętości 20 µl, w temperaturze 16°C przez 16 godzin. Do wektora plazmidowego i odpowiedniej wstawki dodawano ligazę DNA T4, bufor 10x stężony i uzupełniano wodą.

Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Trawienie DNA endonukleazami prowadzono w buforze dostarczonym przez producenta restryktaz, w końcowej objętości 20 µl, w temperaturze 37°C, przez 30 minut.

Mieszanina do syntezy cDNA

Syntezę cDNA prowadzono z wykorzystaniem zestawu SuperScriptIII firmy One-Step firmy Thermo Fisher Scientific w objętości 20 µl, zgodnie z protokołem producenta. W skład mieszaniny reakcyjnej oprócz RNA wchodził heksanukleotyd starterowy, bufor reakcyjny, First-Strand Reaction Mix 2 × stężony oraz SuperScriptIII/RNase OUT Enzyme Mix.

Mieszanina do reakcji qRT-PCR

Reakcję ilościowej amplifikacji w czasie rzeczywistym prowadzono z wykorzystaniem zestawu PowerUp SYBR Green Master Mix. Do 10 ng cDNA dodawano polimerazę, odpowiednie oligonukleotydy, SYBR Green master mix. Reakcję prowadzono w objętości 20 µl. W razie potrzeby uzupełniano wodą.

Mieszanka do testowania aktywności białek

Mieszaninę do testowania aktywności białek przygotowano w objętości 20 µl. Skład buforu oraz stężenie białka dobierano eksperymentalnie. Do reakcji dodawano znakowane fluorescencyjnie substraty RNA lub DNA w ilości 125 nM.

3.9. Bufory i roztwory

- Bufory do elektroforezy pionowej i poziomej

Bufor TAE do elektroforezy w żelu agarozowym 50×stężony, pH=8

2 M Trizma

0,5 M EDTA

Bufor TGB do elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym 5×stężony

0,025 M Trizma

0,192 M Glicyna

0,1% SDS

- Bufory obciążające

Bufor do obciążania próbek DNA 6×stężony

30% Glicerol

0,25% Błękit bromofenolowy

Bufor do obciążania próbek białkowych 4×stężony

40% Glicerol

0,4% Błękit bromofenolowy

8% SDS

400 mM DTT

200 mM Tris-HCl pH=6,8

- Bufory do oczyszczania białek

Bufor wiążący i płuczący

50 mM TrisHCl lub HEPES pH 7.5

150 mM NaCl

40 mM imidazol

0,1 mM PMSF

2mM β -mercaptoethanol

10% glicerol

Bufor do lizy osadu

bufor wiążący z dodatkiem:

Inhibitor proteaz koktajl 1000x

TritonX-100

DENERASE

Bufor do elucji

50 mM TrisHCl lub HEPES pH 7.5

150 mM NaCl

300 mM imidazol

0,1 mM PMSF

2mM β -mercaptoethanol

10% glicerol

- Bufory do hybrydyzacji metodą Southern blot

Bufor do depurynacji

35% HCl

Bufor do denaturacji

1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

Bufor do neutralizacji, pH=7,5

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl pH=7,5

Bufor hybrydyzacyjny

0,5 M NaCl

4% odczynnik blokujący

Bufor SSC (20x stężony), pH 7

cytrynian sodu - 0,3 M

NaCl - 3 M

Bufor przemywający I

mocznik - 2 M

SDS - 0,1%

NaH₂PO₄ pH 7 - 50 mM

NaCl - 150 mM

MgCl₂ - 1 mM

odczynnik blokujący - 0,2%

Bufor przemywający II (20x stężony), pH 10

NaCl - 2 M

Tris-HCl - 1 M

Bufor przemywający II (roboczy)

bufor przemywający II (1x stężony)

MgCl₂ - 0,2 mM

- Bufory do hybrydyzacji metodą Western blot

Roztwór wyjściowy 10×stężony, pH=8,3

1,92 M Glicyna

250 mM Tris-HCl

Bufor do transferu

Roztwór wyjściowy rozcieńczony w 20% metanolu

Bufor blokujący

10% mleko w buforze TBS

Bufor do rozcieńczania przeciwciał

10% mleko w buforze TBS-T

Bufor TBS

200 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,4

Bufor TBS-T

200 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH=7,4

0,05% Tween 20

Mysia surowica odpornościowej skierowanej przeciwko białku PAPI oraz PNP

Surowicę uzyskała dr hab. Bożena Dziadek, prof. nadzw. UŁ, w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego.

Roztwór króliczych przeciwciał znakowanych peroksydazą chrzanową skierowanych przeciwko immunoglobulinom mysim

Przeciwciała komercyjne (Dako)

Roztwór ECL do wywołania reakcji chemiluminescencji

Mieszanka komercyjnych odczynników w proporcji 1:1 Pierce ECL Western Blotting Substrate

3.10. Markery wielkości

- Markery do określania wielkości DNA

GeneRuler™ 1 kb (Thermo Scientific) zawiera fragmenty DNA o wielkościach: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz

GeneRuler™ 100 pz (Thermo Scientific) zawiera fragmenty DNA o wielkościach: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz

- Markery do określania wielkości białek

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) zawiera rekombinowane białka o wielkościach: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150, 250 kDa

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) zawiera rekombinowane białka o wielkościach: 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 180 kDa

3.11. Żele do elektroforezy

Żel agarozowy do elektroforezy poziomej

1 % agarozą (BioShop) w buforze TAE

Żel poliakrylamidowy do pionowej elektroforezy białek

- Żel rozdzielający

30% akrylamid (BioRad) - 12%

Tris-HCl pH 8,8 (Serva) - 0,36 M

SDS (Sigma) - 0,1%

APS (Sigma) - 0,1%

TEMED (Sigma) - 0,1%

H₂O

- Żel zateżający

30% akrylamid (BioRad) - 5%

Tris-HCl pH 6,8 (Serva) - 0,1 M

SDS (Sigma) - 0,1%

APS (Sima) - 0,1%

TEMED (Sigma) - 0,1%

H₂O

Żel poliakrylamidowy do pionowej elektroforezy kwasów nukleinowych

40% akrylamid (BioRad) – 15%

Mocznik - 15%

Bufor TBE

TEMED (Sigma) - 0,1%

APS (Sima) - 0,1%

H₂O

3.12. Pozostałe odczynniki

- β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Bibuła chromatograficzna (Whatman)
- Bromek etydyny (Sigma-Aldrich)

- Chloroform (Sigma)
- CH₃COOK - octan potasu (Sigma)
- Ditiotreitól (DTT) (Sigma-Aldrich)
- DMSO (BioShop)
- DNAzol (Invitrogen)
- Etanol (Polmos)
- Fluorek fenylometrylosulfonylu (PMSF) (Sigma-Aldrich)
- Glicerol (Sigma)
- Imidazol (Sigma-Aldrich)
- Instant Blue (Expedeon)
- IPTG (Sigma-Aldrich)
- Kanamycyna (BioShop)
- Klisze rentgenowskie Pierce CL-Xposure (Thermo Scientific)
- Kolumna HiPrep™ 16/60 Sephracyl™S – 200 HR (Cytiva)
- Kulki cyrkoniove 0,1 mm (BioSpec Products)
- Kulki krzemionkove 0,1 mm (MP Biomedicals)
- Kulki magnetyczne (Omega BIO-TEK)
- Kuwety do elektroporacji (Sigma-Aldrich)
- Membrana nylonowa Amersham Hybond-N (GE Healthcare)
- Mocznik (Sigma-Aldrich)
- Nadsiarczan amonu (APS) (Sigma-Aldrich)
- RNaza (Sigma-Aldrich)
- TEMED (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- TRIzol (Invitrogen)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- Tween 80 (Sigma-Aldrich)
- Tyloxapol (Sigma-Aldrich)
- Woda DEPC (Ambion)
- 30% H₂O₂ (Sigma-Aldrich)

3.13. Zestawy komercyjne wykorzystane w badaniach

- Do izolacji plazmidowego DNA - Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)
- Do elucji DNA z żelu agarozowego - QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Do hybrydyzacji typu Southern - Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Biosciences)
- Do qRT-PCR - Power Up SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)
- Do rybodeplecji - riboPOOL, siTOOLS Biotech GmbH, Planegg/Martinsried, Germany
- Do przygotowania bibliotek RNA-Seq - KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS), TrueSeq Small RNA Library (Illumina), VAHTS mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme Biotech)
- Do sprawdzenia jakości RNA – Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent)
- Do analizy bibliotek - Agilent DNA 1000 Kit (Agilent) oraz Agilent DNA High Sensitivity KIT (Agilent)
- Do wywoływania Western blot - Pierce ECL Western Blotting Substrate

3.14. Aparatura

- Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
- Gene Pulster (BioRad)
- Homogenizator - FastPrep-24 MP (Biomedicals)
- Sekwencjator - NextSeq 500 (Illumina)
- Skaner fluorescencyjny - Typhoon 8600 Imager Scanner (GE Healthcare)
- Spektrofotometr/Fluorymetr - DS-11 FX (DeNovix)
- Sprzęt do wywoływania filmów rentgenowskich - Medical X-ray Processor (Kodak)
- System AKTA (GE Healthcare)
- Termocykler 96-dołkowy - Applied (Biosystems)

- QuantStudio Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific)
- UV -Stratalinker 1800 firmy (Stratagene)
- Wirówka do probówek typu Eppendorf - MiniSpin (Eppendorf)
- Wirówka do probówek typu Falcon – 5804 (Eppendorf)
- Wytrząsarka (Infors Orbitron)

4. Metody

4.1 Hodowle bakteryjne

Szczepy *Escherichia coli* hodowano w temperaturze 37 °C w podłożu LB. Hodowle płynne inkubowano przez 16 do 24 godzin na wytrząsarce o ruchu obrotowym (140 rpm), w szklanych probówkach lub kolbach. Hodowle na podłożu stałym (z dodatkiem 2% agaru) prowadzono na szalkach Petriego.

Szczep *Mycobacterium smegmatis* mc²155 inkubowano w temperaturze 37°C w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC oraz 0,05% Tween 80. Hodowle płynne inkubowano przez 16 do 24 godzin (logarytmiczna faza hodowli) lub około 120 godzin (faza stacjonarna) na wytrząsarce o ruchu obrotowym (140 rpm), w szklanych kolbach. Hodowle na podłożu stałym Middlebrook 7H10 suplementowanym 10% OADC i 0,5 %glicerolem prowadzono na szalkach Petriego.

Szczep *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv hodowano w temperaturze 37°C w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC oraz 0,05% Tween 80 w butelkach hodowlanych od 5-14 dni. Hodowle na podłożu stałym Middlebrook 7H10, OADC i glicerolem prowadzono na szalkach Petriego przez 3 tygodnie.

Do pożywki dodawano antybiotyki lub inne substancje w zależności od prowadzonych eksperymentów.

4.2. Izolacja plazmidowego DNA z komórek *E. coli*

Plazmidowy DNA izolowano z wykorzystaniem zestawu odczynników Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), zgodnie z zaleceniami producenta.

4.3. Izolacja chromosomalnego DNA

Chromosomalny DNA izolowano z wykorzystaniem metody mechanicznej dezintegracji komórek.

Materiał *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis* pobrano eżąd do probwki typu Eppendorf z 200 µl buforu TE oraz kulkami cyrkoniowymi o średnicy 0,1 mm. Następnie komórki rozbito mechanicznie przy pomocy urządzenia FastPrep®-24 (MP Biomedicals) - 2 razy po 45 sekund (6 m/s) i przeprowadzono lizę komórek z wykorzystaniem DNA-zolu. W celu oczyszczenia chromosomalnego DNA do zawiesiny dodano 200 µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy (24 : 1). DNA precypitowano trzema objętościami 96% etanolu z dodatkiem 0,1 objętości próbki 5MACK. Preparaty DNA trawiono RNazą aby pozbyć się cząsteczek RNA.

4.4. Izolacja całkowitego RNA z komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*

RNA izolowano z osadów komórkowych, które zawieszano w 300 µl wody DEPC. Do zawiesiny dodawano 900 µl odczynnika TRIzol, następnie przenoszono do probówek Lysing Matrix (MP Biomedicals) z krzemionkowymi kuleczkami o średnicy 0,1 mm. Probówki homogenizowano dwukrotnie 45 sekund (6 m/s) na urządzeniu FastPrep®-24 (MP Biomedicals). Po osadzeniu się kuleczek na dnie probówki, pobierano supernatant, który przenoszono do probówki typu Eppendorf i wirowano przez 8 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 12 000 g. Po wirowaniu, supernatant przenoszono do nowej probówki i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie do lizatu dodawano 250 µl chloroformu i mieszano przez 2 minuty. Próbkę inkubowano przez 10 minut na lodzie i wirowano przez 15 minut w temperaturze 4 °C, przy prędkości 12000 g. Do probówki przenoszono około 2/3 górnej fazy wodnej, którą następnie precypitowano 1 objętością izopropanolu, 1/10 objętością 3 M octanu sodu o pH 5,7 oraz 1 µl odczynnika GlycoBlue (Invitrogen). Precypitację prowadzono w temperaturze -80°C

przez noc. Po inkubacji próbki wirowano przez 30 minut w temperaturze 4 °C, przy prędkości 20 000 g, kolejno supernatant zlewano a osad przemywano 500 µl 70% schłodzonego etanolu. Próbki ponownie wirowano przez 30 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 20 000 g, następnie supernatant zlewano, natomiast osad suszono w temperaturze pokojowej przez około 15 minut i zawieszano w 50 µl wody DEPC. Uzyskany całkowity RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Preparaty RNA trawiono DNazą Turbo (Invitrogen), zgodnie z wytycznymi producenta.

4.5. Amplifikacja DNA przy pomocy reakcji PCR

Reakcję amplifikacji DNA wykonano z użyciem polimerazy AccuPrime Pfx lub KAPA Taq, oligonukleotydowych sekwencji (Materiały 3.4.) oraz buforu zalecanego przez producenta, w objętości 50 µl i umieszczano w termocyklerze. Amplifikacja obejmowała denaturację dwuniciowego DNA oraz 35 powtarzających się cykli:

- denaturacja (90 sekund, 95°C)
- przyłączanie oligonukleotydów (45 sekund, temperatura zależna od temperatury mięknięcia syntetycznych oligonukleotydów)
- wydłużanie łańcucha (60 sekund na każde 1000 pz, temperatura 68 lub 72°C)

Kończącym etapem reakcji była elongacja (15 minut w temperaturze odpowiedniej dla używanej polimerazy).

4.6. Trawienie enzymami restrykcyjnymi

DNA trawiono z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych oraz buforu FastDigest przez 30 minut w temperaturze 37°C.

4.7. Elektforeza pozioma w żelu agarozowym

Elektforezę w żelu agarozowym prowadzono w celu rozdzielenia cząsteczek DNA względem markera wielkości. Rozdział zachodził w buforze 1 x TAE przy

odpowiednim napięciu (5 V na 1 centymetr odległości między elektrodami). Produkty rozdziału wizualizowano w świetle UV o długości fali 260 nm.

4.8. Elucja DNA z żeli agarozowych

Elucję rozdzielonych fragmentów DNA z żelu agarozowego wykonywano z wykorzystaniem zestawu QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) zgodnie z zaleceniem producenta.

4.9. Precypitacja DNA

Precypitację DNA prowadzono z użyciem 3 objętości 95% etanolu i 0,1 objętości 5M octanu potasu. Mieszaninę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze - 70 °C i wirowano przez 10 minut w temperaturze 4 °C prędkości 12 000 g. Otrzymany osad przemywano 70% etanolem i wirowano w takich samych warunkach. Wysuszony osad DNA zawieszano w wodzie.

4.10. Łączenie fragmentów DNA

Łączenie fragmentów DNA wykonywano z zastosowaniem enzymu ligazy T4 przez 16 godzin w temperaturze 16 °C lub przez 2 godziny w temperaturze 22 °C.

4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA

Stężenie oraz czystość DNA i RNA mierzono z wykorzystaniem sprzętu DS-11 FX firmy DeNovix.

4.12. Sekwencjonowanie fragmentów DNA

Produkty amplifikacji DNA sprawdzano poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger na urządzeniu Genetic Analyzer 3500, obsługiwanym przez dr Małgorzatę Korycką – Machałę.

4.13. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* z zastosowaniem chlorku rubidu

Szczep *E. coli* Top 10 hodowano w temperaturze 37°C do OD₆₀₀=0,5 (współczynnik gęstości optycznej) w objętości 100 ml podłoża LB. Po inkubacji hodowlę inkubowano w łaźni lodowej przez 30 minut, wirowano 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 3 900 g. Osad komórek inkubowano w buforze I (Materiały 3.9.) przez 2 godziny, następnie wirowano i osad zawieszono w buforze II (Materiały 3.9.) i porcjowano po 100µl do jałowych probówek typu Eppendorf. Komórki kompetentne przechowywano w temperaturze -80°C

4.14. Transformacja metodą szoku cieplnego

Komórki kompetentne po rozmrożeniu inkubowano z DNA plazmidowym przez 30 minut w łaźni lodowej. Następnie komórki inkubowano w temperaturze 42°C przez 90 sekund i schładzano przez 2 minuty na lodzie. Do komórek dodawano 0,5 ml podłoża LB i inkubowano w temperaturze 37°C, na wytrząsarce przez 1 godzinę. Po inkubacji mieszaninę wysiewano na podłoże LB z odpowiednimi czynnikami selekcyjnymi.

4.15. Przygotowanie komórek kompetentnych *M. smegmatis*

Hodowlę *M. smegmatis* w objętości 100 ml prowadzono do wartości OD₆₀₀=0,6 – 0,8 (współczynnik gęstości optycznej). Po 1,5 godzinnej inkubacji w łaźni lodowej, hodowlę wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 3 900 g. Osad 3-krotnie zawieszano w jałowym 10% glicerolu, zmniejszając jego objętość od 90ml, 45ml do 20ml. Następnie komórki zawieszano w 1 ml 10% glicerolu i porcjowano po 100 µl do probówek typu Eppendorf.

4.16. Przygotowanie komórek kompetentnych *M. tuberculosis*

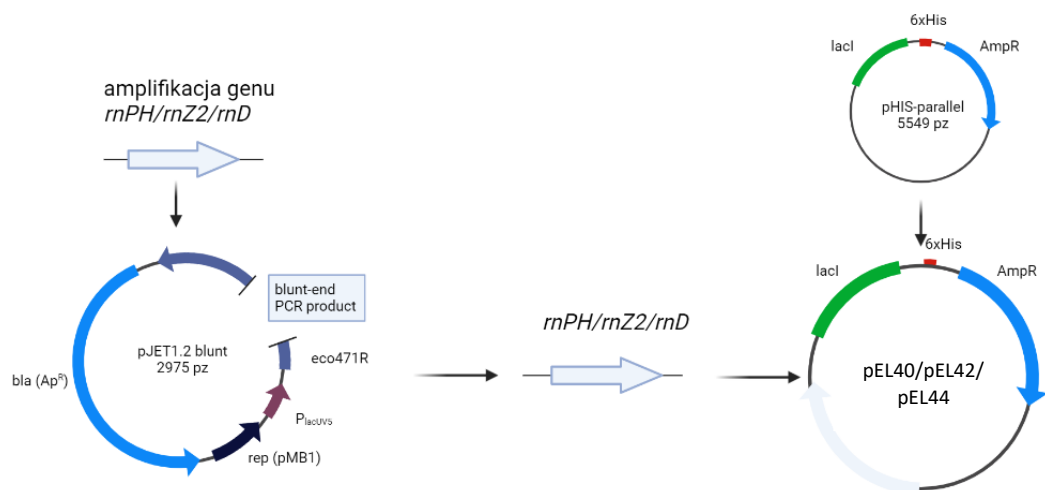
Hodowlę *M. tuberculosis* prowadzono w objętości 10 ml do wartości OD₆₀₀=0,8 – 1 (współczynnik gęstości optycznej). Do hodowli dodano jałową glicynę (końcowe stężenie 1,5%) i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C. Po inkubacji hodowlę wirowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, przy prędkości 3 900 g. Osad trzykrotnie płukano w jałowym 10% glicerolu w objętości odpowiednio 5ml; 2,5ml i 1ml. Ostatecznie osad zawieszano w 400 µl i porcjowano po 200 µl.

4.17. Elektrotransformacja komórek *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*

Wprowadzając plazmidowy DNA do wnętrza komórek zastosowano technikę elektroporacji, polegającą na destabilizacji osłon komórkowych pod wpływem impulsu prądu elektrycznego. Komórki kompetentne wraz z obcym DNA przenoszono do zmrożonych kuwet i przeprowadzano elektrotransformację (napięcie 2,5 kV, opór 1000 Ω , pojemność elektryczna 25 μF). Następnie komórki przenoszono do probówki typu falcon z podłożem hodowlanym (Middlebrook 7H9 OADC/ Tween 80) i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C na wytrząsarce.

4.18. Konstrukcja plazmidów do nadekspresji rekombinowanych białek

Po amplifikacji fragmentu DNA, zawierającego badane geny kodujące RNazę PH, D i Z2 na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* mc^2 , produkty PCR klonowano do wektora pJET 1.2, sekwencjonowano metodą Sangera a następnie trawiono z wykorzystaniem odpowiednich endonukleaz (BamHI i HindIII – RNaza Z2, BglIII i HindIII – RNaza PH, NcoI i HindIII – RNaza D) i klonowano do wektora ekspresyjnego pHIS (Rycina 4.18). Uzyskane rekombinowane plazmidy transformowano do komórek *E. coli* Top10 a następnie *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 (DE3) *pLysS* i *E. coli* Rosetta.



Rycina 4.18. Schemat konstrukcji plazmidów do nadprodukcji białek w komórkach *E. coli*.

4.19. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanych białek z komórek *E. coli*

Hodowlę *E. coli* niosących plazmidy ekspresyjne, prowadzono w 37°C do OD₆₀₀=0,6 – 0,8. Ekspresję białek indukowano IPTG (izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd). Parametry takie jak: stężenie induktora, temperatura i czas indukcji zostały zoptymalizowane poprzez próbną indukcję. Hodowlę na dużą skalę prowadzono w kolbach w objętości 500 ml.

Białka oczyszczono metodą chromatografii powinowactwa, na kolumnach ze złożem niklowym lub kobaltowym. Do rozmrożonego osadu komórek dodano 10 ml buforu lizującego z dodatkiem PMSF w stężeniu 0,1 mM i β-merkaptoetanolu w stężeniu 2 mM. Zawiesinę sonikowano sondą ultradźwiękową i wirowano w 4°C przez 50 minut, przy prędkości 19 000 g. Po kalibracji kolumny buforem, nakładano na nią supernatant. Kolumnę płukano buforem płuczącym a białko eluowano 10ml buforu do elucji (10 próbek po 1 ml). Próbkę poszczególnych frakcji analizowano na żelu SDS-PAGE.

4.20. Doczyszczanie białek z wykorzystaniem systemu AKTA start

Po analizie frakcji białka zebranych podczas elucji poszczególne próbki łączono i zatężano na koncentratorach do białek do objętości 500 μl. Przygotowany w ten sposób preparat nanoszono na kolumnę HiPrep™ 16/60 Sephacyl™S – 200 HR do filtracji żelowej zainstalowanej w systemie AKTA start. Doczyszczono frakcje białka zebrano i skoncentrowano.

4.21. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano z zastosowaniem odczynnika Bradford Reagent oraz sprzętu DS-11 FX firmy DeNovix. Do kuwety dodawano 1 ml odczynnika i po 10 μl wzorcowych roztworów BSA oraz badanych białek. Po 10 minutach inkubacji, dokonywano pomiaru absorbancji roztworów, przy długości fali 595 nm wobec próby ślepej, którą stanowił sam odczynnik.

4.22. Jednokierunkowa elektroforeza pionowa białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

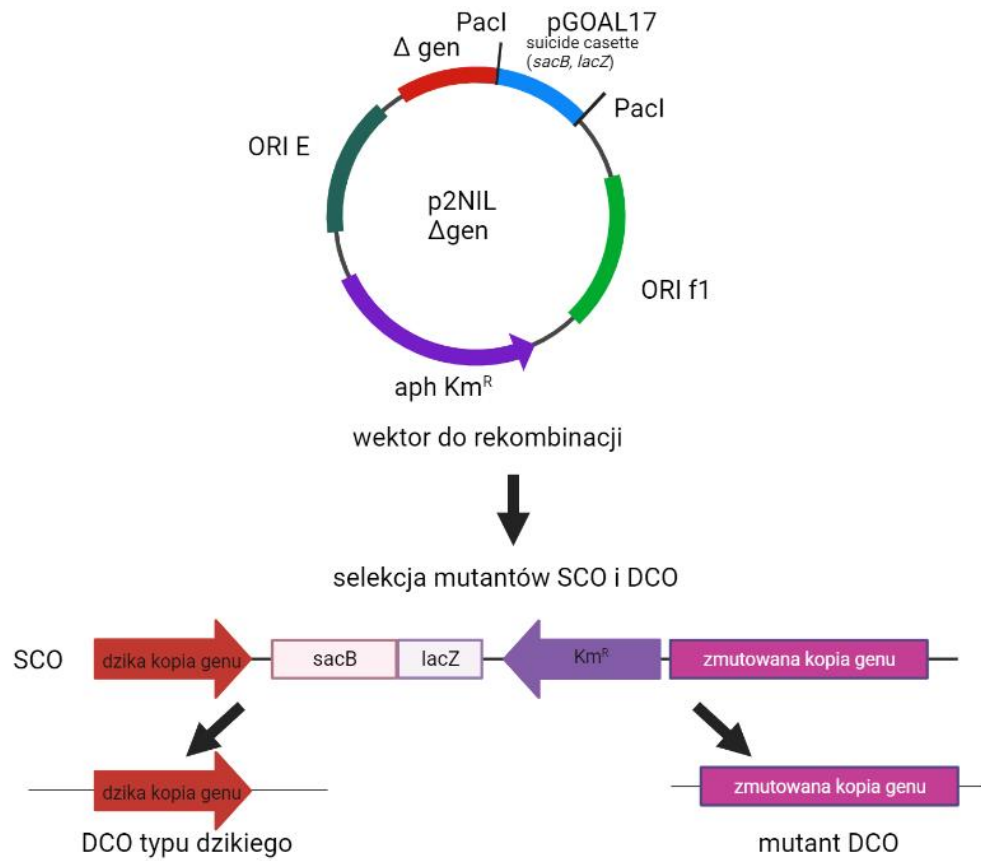
Do rozdzielania białek względem ich masy cząsteczkowej wykorzystano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Przed nałożeniem próbek na żel mieszano je z buforem obciążającym i denaturowano w temperaturze 95 °C przez 10 minut. Rozdział prowadzono w buforze TGB przy napięciu prądu 140 V. Po zakończonym rozdziale żel barwiono barwnikiem Instant Blue i porównywano wielkość białka z markerem.

4.23. Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej

Konstrukcja wektorów do rekombinacji homologicznej polegała na wklonowaniu do wektora p2NIL fragmentów DNA otaczających badany gen z wewnętrzną delecją oraz kasetą markerową pochodzącą z pGOAL17. Uzyskany wektor niósł geny markerowe: *aph* – warunkujący oporność na kanamycynę, *sacB* – warunkujący wrażliwość na sacharozę oraz *lacZ* – nadający komórkom zdolność do rozkładu X-galu. Geny markerowe pozwalały na odróżnienie szczepów SCO (pojedynczych krzyżowych rekombinantów) i DCO (podwójnych krzyżowych rekombinantów) od szczepu dzikiego.

4.24. Otrzymywanie mutantów SCO i DCO

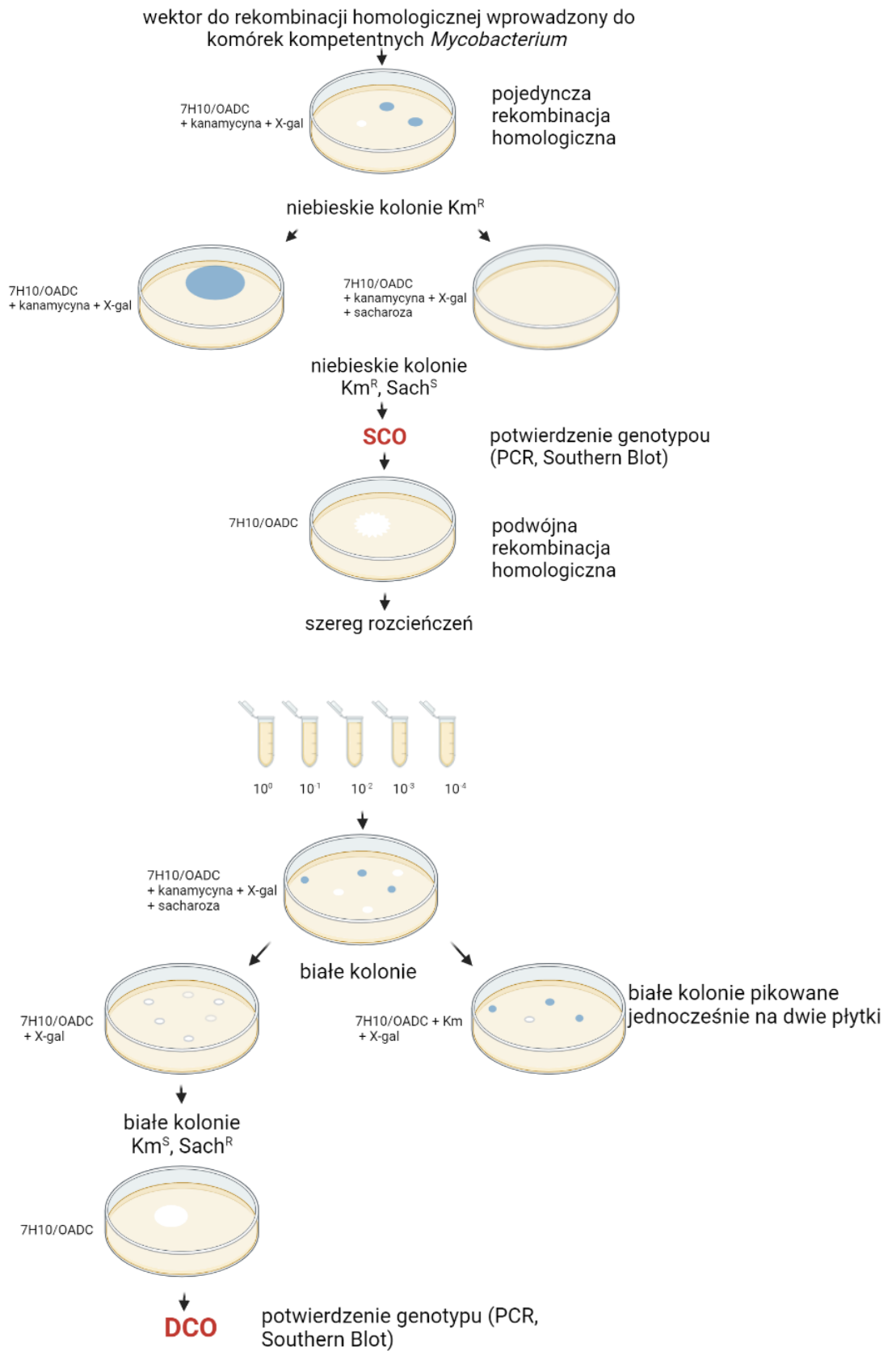
Przygotowane wektory plazmidowe do rekombinacji homologicznej wprowadzono do komórek kompetentnych *M. smegmatis*. Mutanty SCO uzyskane w wyniku pojedynczej rekombinacji homologicznej nabywają cech kodowanych przez geny obecne na plazmidzie. W wyniku podwójnej rekombinacji homologicznej uzyskuje się mutanty DCO. DNA plazmidowy niosący geny markerowe zostaje utracony, jednocześnie dochodzi do delecji „dzikiej” lub zmutowanej kopii genu (Rycina 4.24).



Rycina 4.24. Schemat otrzymywania mutantów SCO i DCO.

4.25. Poszukiwanie mutantów SCO i DCO

W celu typowania mutantów SCO i DCO wykorzystano podłoża zawierające odpowiednie czynniki selekcyjne (sacharozę, X-gal) (Rycina 4.25).



Rycina 4.25. Schemat poszukiwania mutantów SCO i DCO.

4.26. Hybrydyzacja metodą Southern blot

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

4.27. Analiza wzrostu szczepów *M. smegmatis* pomiar gęstości optycznej (OD₆₀₀)

Krzywą wzrostu szczepów bakterii w podłożu bogatym i minimalnym wyznaczano poprzez czasowe (co 3 godz.) pomiary gęstości optycznej hodowli. Hodowle w logarytmicznej fazie wzrostu (OD₆₀₀ 0,8) rozcieńczano do jednakowej gęstości a następnie wykonywano pomiary gęstości optycznej w 6, 9, 24 i 48 godzinie hodowli.

4.28. Globalna analiza transkryptomu szczepów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis*

W celu globalnej analizy transkryptomu badanych szczepów jakością wyizolowanego RNA sprawdzono z wykorzystaniem zestawu Agilent RNA oraz aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer. RNA oczyszczono wykorzystując kulki magnetyczne Mag – Bind TotalPure NGS (Omega). Całkowity RNA zawiera dużą pulę rRNA, którego ilość zmniejszono wykonując rybodeplecję próbek z wykorzystaniem zestawu Pan-Actinobacterial riboPOOL. Biblioteki RNA przygotowano przy użyciu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS), TrueSeq Small RNA Library Preparation (Illumina) lub VAHTS mRNA-seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme biotech). Jakość oraz ilość bibliotek określano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Agilent DNA 1000 Kit (Agilent). Uzyskane biblioteki zostały zsekwencjonowane przez dr Marcina Słomkę, w ramach współpracy z laboratorium BioBank Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, z wykorzystaniem urządzenia NextSeq 500 firmy Illumina. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania RNA została wykonana

przez dr Przemysława Płocińskiego z Instytutu Biologii Medycznej PAN oraz autorkę niniejszej pracy.

4.29. Analiza RNA z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern blot

Hybrydyzację typu Northern zastosowano do określenia ilości poszczególnych cząsteczek tRNA dla szczepu dzikiego oraz mutantu *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem białka PAPI. Całkowity RNA w ilości 2 – 5 µg naniesiono na 1,2% żel agarozowy lub 12% żel poliakrylamidowy. Następnie wykonano transfer rozdzielonych próbek RNA na membranę nylonową.

W przypadku żeli agarozowych zastosowano transfer kapilarny w buforze 20 x SSC, zaś żeli akrylamidowych w buforze 0,5 x TBE, według protokołu opisanego przez Jansen i wsp. 2012. Po utrwaleniu membrany w świetle UV (260 nm) prowadzono hybrydyzację sondami oligonukleotydowymi znakowanymi γ -³²P-ATP. Po płukaniu membrany, sygnał transferowano przez 1 godzinę na ekran do obrazowania. W celu wizualizacji wyników, ekran skanowano przy użyciu aparatu Typhoon 8600 Imager Scanner.

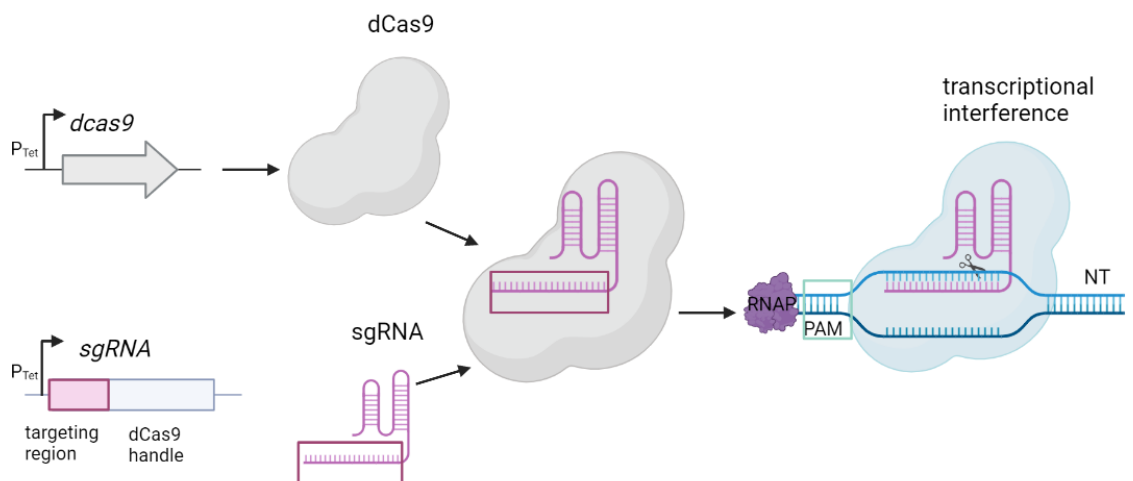
4.30. Immunodetekcja białek za pomocą Western blot

Białka rozdzielane w żelach SDS-PAGE przenoszono na membranę PVDF przez 16 godzin w buforze do transferu, w temperaturze 4°C, przy natężeniu prądu 50 mA. Po transferze, membranę blokowano w buforze blokującym i inkubowano na kołysce laboratoryjnej przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji bufor blokujący zlewano, a do kuwety dodawano 10 ml roztworu z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Membranę inkubowano przez kolejne 1,5 godziny na kołysce laboratoryjnej. Kolejno, przeciwciała niezwiązane z białkiem odpłukiwano poprzez sześciokrotne płukanie membrany buforem TBS-T. Następnie membranę inkubowano z 10 ml przeciwciał drugorzędowych rozcieńczonych w buforze TBS, przez 1,5 godziny. Po inkubacji przeciwciała odpłukiwano poprzez sześciokrotne płukanie membrany po 5 minut. Na membranę nanoszono substrat dla peroksydazy, z którym inkubowano przez 2 minuty. Po tym czasie membranę umieszczano w kasecie rentgenowskiej, następnie

w ciemni na membranę nakładano kliszę rentgenowską. Ekspozycję prowadzono od 30 sekund do kilku minut, po czym kliszę wywoływano w Medical X-ray Processor (Kodak).

4.31. Konstrukcja mutantów CRISPR-Cas9

W celu przygotowania mutantów z obniżonym poziomem ekspresji białka $CCA_{Mtb/Msm}$ oraz PNPazy wykorzystano sekwencje oligonukleotydowe komplementarne do badanych genów w sąsiedztwie sekwencji PAM (Protospacer Adjacent Motif), które poddano łączeniu (annealing). Przygotowane w ten sposób sekwencje oligonukleotydowe klonowano do plazmidu pLJR962 lub pLJR965 (odpowiednio dla *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis*), trawionego wcześniej enzymem BsmBI. Mieszaninę ligacyjną transformowano do komórek kompetentnych *E. coli* Top10 a otrzymane plazmidy poddawano sekwencjonowaniu metodą Sangera celem sprawdzenia obecności klonowanych sekwencji oligonukleotydowych dla badanych genów. Następnie rekombinowane plazmidy transformowano do komórek kompetentnych *M. smegmatis* lub *M. tuberculosis*. Z wybranych elektrotransformantów wyizolowano chromosomalny DNA, w celu potwierdzenia integracji plazmidów z chromosomalnym DNA z wykorzystaniem sekwencji starterowych (Materiały 3.4.). Rycina 4.31 przedstawia sposób zastosowania systemu CRISPR-Cas9.



Rycina 4.31. Obniżanie poziomu ekspresji genów za pomocą systemu CRISPRi/dCas9.

4.32. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym

Metodą ilościowego PCR (qRT-PCR) analizowano poziom transkryptów genu *pcnA_{Mtb}*, wykorzystując próbki RNA izolowanego z mutantów z obniżonym poziomem białka PAPI (PAPI_{CRISPR/Cas9}). RNA poddano odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem oligonukleotydów komplementarnych do genu z użyciem zestawu SuperScript III FirstStrand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Reakcje ilościowego PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) na urządzeniu Quant Studio 5 (Applied Biosystems). Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem: początkowej denaturacji w 50°C i 95°C przez 2 minuty, 45 cykli denaturacji (95°C, 15 s), przyłączania starterów (65°C, 15 s) oraz wydłużania transkryptu (72°C, 60 s). Dla każdej reakcji PCR wykonywano analizę krzywej topnienia, aby sprawdzić jednorodność powstałych produktów PCR.

4.33. Analiza wyników qRT-PCR metodą komparatywną

Metoda komparatywna (Livak & Schmittgen, 2001) pozwala na obliczenie względnych różnic poziomu ekspresji analizowanego genu między szczepami badanymi, a szczepem kontrolnym. Poziom badanego transkryptu odnosi się do poziomu ekspresji genu referencyjnego *sigA*. Po przeprowadzonej analizie wyznaczano cykle progowe (Ct – ang. copy treshold) reakcji amplifikacji genów badanych oraz referencyjnego w szczepie kontrolnym oraz szczepach badanych. Dla wszystkich szczepów bakteryjnych wyznaczano różnicę pomiędzy wartościami Ct genu analizowanego i genu referencyjnego (ΔCt):

$$\Delta Ct (\text{szczep badany}) = Ct \text{ genu analizowanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

$$\Delta Ct (\text{szczep dziki}) = Ct \text{ genu analizowanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

Następnie dla każdego szczepu badanego obliczano wartość podwójnej delty ($\Delta\Delta Ct$):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{szczep badany}) - \Delta Ct (\text{szczep dziki})$$

Względny poziom ekspresji analizowanego genu między szczepami badanymi, a szczepem kontrolnym wyznaczano ze wzoru:

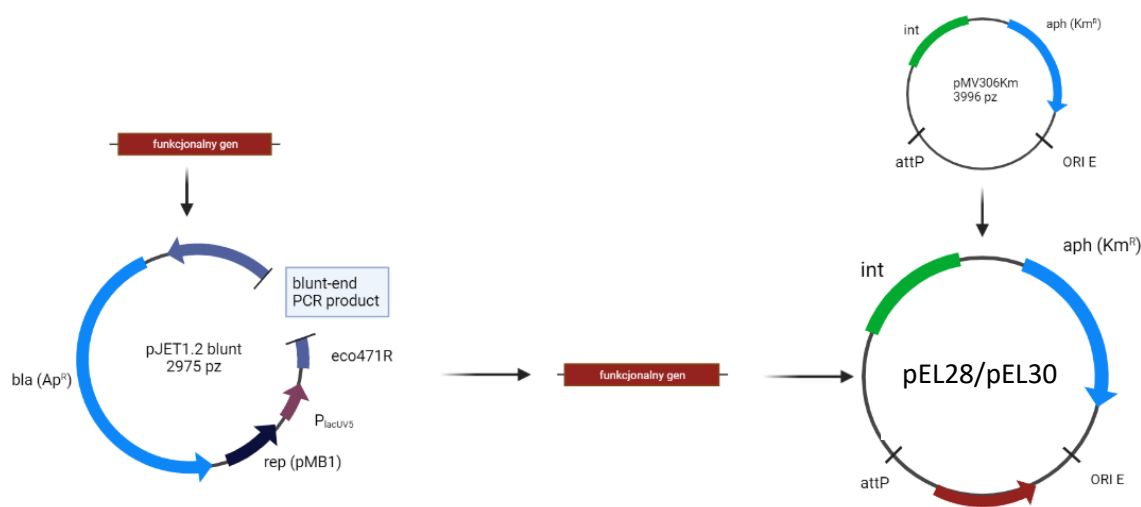
$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Wartość parametru R równa 1 informuje, że poziom ekspresji genu w szczepie badanym i szczepie kontrolnym jest taki sam. Wartość poniżej 1 oznacza, że poziom ekspresji w szczepie dzikim jest wyższy niż w szczepie badanym, i na odwrót w przypadku, gdy wartość R jest większa od 1.

4.34. Przygotowywanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*

Odpowiednio do danego eksperymentu przygotowane hodowle szczepów wirowano przez 5 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 14 100 g. Zlewano supernatant a osad zawieszano w 200 µl buforu TE. Następnie zawiesinę przenoszono do probówki Eppendorf, do której dodawano 2 – 3 krople kulek cyrkonowych. Osady homogenizowano przez 45 sekund, przy użyciu urządzenia FastPrep®-24 (MP Biomedicals). Do zawiesiny dodawano SDS do końcowego stężenia 2%. Następnie próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze 55°C i wirowano przez 10 minut w temperaturze 4°C, przy prędkości 3 900 g. Supernatant przenoszono do nowych probówek Eppendorf i przechowywano w temperaturze -20°C.

4.35. Konstrukcja plazmidów do komplementacji



Rycina 4.35. Schemat konstrukcji rekombinowanych plazmidów do komplementacji.

Aby uzyskać wektory integracyjne do komplementacji mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących *rnT* oraz *rnZ1* *M. smegmatis*, przeprowadzano niezależną amplifikację genów na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis*, z użyciem odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych zamieszczonych w tabeli 4.3. Uzyskane produkty amplifikacji dla poszczególnych genów klonowano w wektorze pJET 1.2, a po weryfikacji ich sekwencji (sekwencjonowanie metodą Sanger) przeklonowano do wektora pMV306Km (w miejsca XbaI/HindIII). Uzyskane na bazie pMV306Km plazmidy komplementacyjne niosące badane geny nazwano pEL28 i pEL30 (Rycina 4.35.).

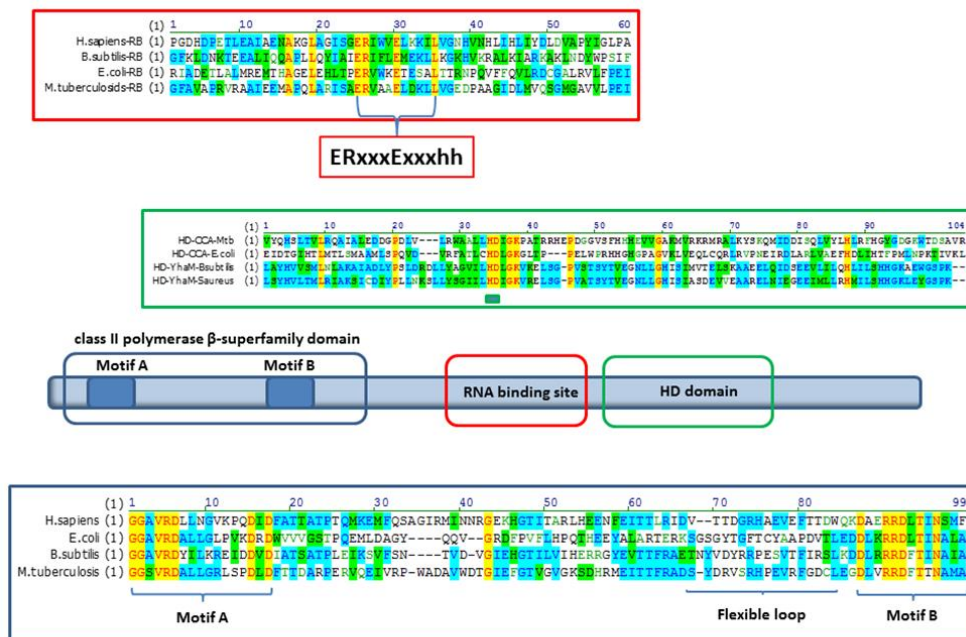
Plazmidy komplementacyjne wprowadzano poprzez elektrotransformację do komórek kompetentnych mutantów DCO mykobakterii pozbawionych funkcjonalnych genów. W wyniku transformacji doszło do integracji plazmidu w miejsce *attB* występujące w DNA chromosomalnym oraz nabycia cech kodowanych przez geny wprowadzone do komórki. Mutanty nabyły zdolność do ekspresji genów, które utraciły w procesie podwójnej rekombinacji homologicznej. Selekcja mutantów posiadających integrowany wektor była możliwa dzięki ekspresji genu nadającego oporność na kanamycynę.

5. Wyniki

5.1 Identyfikacja enzymu o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA w proteomie mykobakterii metodami *in silico*

Każda funkcjonalna cząsteczka tRNA zdolna do aminoacylacji odpowiednim aminokwasem musi zawierać terminalną sekwencję CCA. Analizy baz danych wskazują, że u mykobakterii spośród 45 zidentyfikowanych rodzajów tRNA tylko 23 geny kodują tRNA wraz z terminalną sekwencją CCA (Tabela S1). Wydaje się więc, że proteom mykobakterii musi posiadać enzym o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA (TNT) znany również jako enzym dodający sekwencję CCA (CCA adding enzyme). Analiza anotowanych genów u mykobakterii nie pozwoliła jednak na identyfikację genu kodującego enzym TNT. Z drugiej strony zarówno u *M. tuberculosis* jak i u *M. smegmatis* zidentyfikowano gen (*rv3907c/msmeg_6926*) kodujący inny enzym należący do tej samej klasy polimeraz (nadrodzina β polimeraz i nukleotydylotransferaz klasy II) - poli(A) polimerazę PAPI. Enzymy należące do obu klas nie mogą być łatwo rozróżnione przy zastosowaniu klasycznych analiz porównawczych. Potencjalny produkt genu *rv3907c* *M. tuberculosis* wykazywał podobny poziom homologii (około 30%) z nukleotydylotransferazą tRNA identyfikowaną u *E. coli*, *B. subtilis*, *H. sapiens* czy też poliadenylazą z *E. coli*. Bardziej szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej enzymów należących do ww. klasy pozwoliła jednak na identyfikację pewnych wskaźnikowych, konserwatywnych sekwencji pozwalających na klasyfikację danego enzymu do poliadenylaz lub nukleotydylotransferaz (G. Martin i Keller, 2004). Poli(A) polimerazy posiadają tzw. flexible loop ([LIV]-[LIV]-G-[RK]-[RK]-F-x-[LIV]-h-[HLQ]-[LIV]), który nie występuje u nukleotydylotransferaz, natomiast enzymy zdolne do syntezy terminalnej adeniny oraz sekwencji CCA odróżnia motyw znajdujący się w domenie wiążącej RNA (A-adding, sRxxxExxxhh; CCA-adding, ERxxxExxxhh). Szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej produktu genu *rv3907c* u prątka gruźlicy jasno wskazała na obecność motywu charakterystycznego dla enzymów dodających sekwencję CCA i brak motywu charakterystycznego dla polimeraz poli(A) (Rycina 5.1.). Analiza sekwencji aminokwasowej *Rv3907c* pozwoliła także zidentyfikować w strukturze enzymu N-terminalną domenę charakterystyczną dla nadrodziny β polimeraz

i nukleotydylotransferaz klasy II, centralną domenę wiążącą RNA oraz C-terminalną domenę HD charakterystyczną dla enzymów o aktywności fosfatazy lub fosfodiesterazy.



Rycina 5.1. Analiza dopasowania enzymów dodających CCA. Analiza dopasowania regionów otaczających elastyczną pętlę w enzymach dodających CCA z zaznaczeniem nukleotydylotransferazy tRNA i polimerazy poli(A) reprezentujące domenę nadrodziny β polimerazy klasy II (niebieska ramka). Rv3907c został porównany do CCA tRNA nukleotydylotransferazy *B. subtilis*, *E. coli* i Homo sapiens – mitochondrialnej izoformy 1. Analiza dopasowania miejsc wiążących RNA (czerwona ramka). Motyw konserwatywny enzymu dodającego CCA (ERxxxExxxhh), gdzie x oznacza dowolną, a h oznacza resztę hydrofobową. Analiza domeny HD *M. tuberculosis* i enzymu dodającego CCA *E. coli*, egzorybonukleazy YhaM *B. subtilis* i *S. aureus* z wykorzystaniem oprogramowania Vector NTI 11.5.

Biorąc pod uwagę szczegółową analizę sekwencji aminokwasowej Rv3907c, a także obecność w genomie mykobakterii genów tRNA, które nie kodują terminalnych sekwencji CCA, założono, że produkt genu *rv3907c* jest odpowiedzialny za syntezę terminalnej sekwencji CCA cząsteczek tRNA u mykobakterii. Ponadto wyniki badań naszego zespołu, nie będące częścią niniejszej rozprawy doktorskiej, wykazały niezbędną rolę genu *rv3907c* dla przeżycia prątków oraz potwierdziły *in vitro* aktywność enzymatyczną Rv3907c jako tRNA nukleotydylotransferazy. Dlatego też

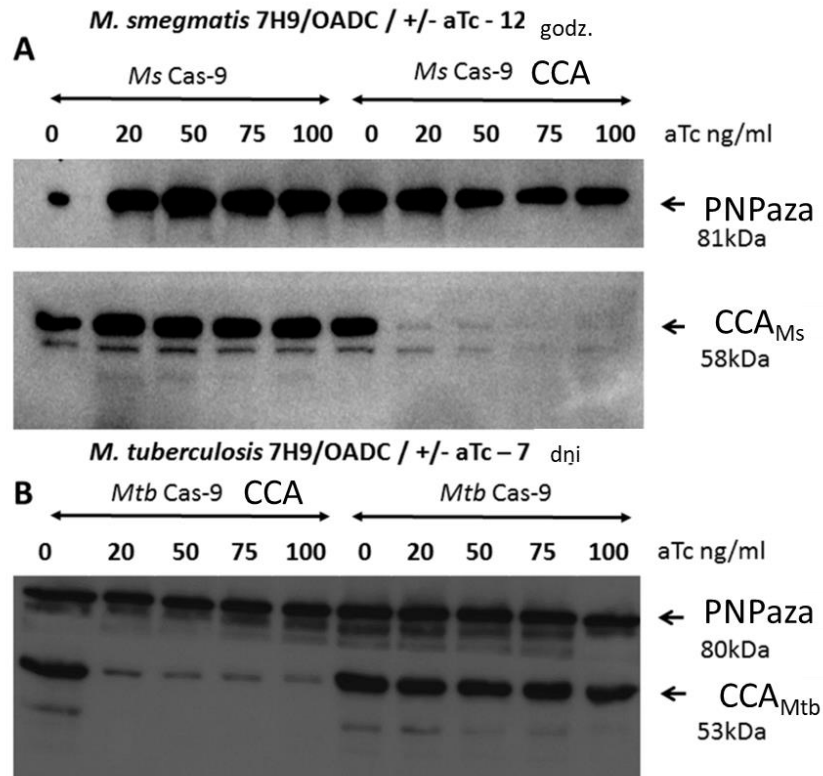
w dalszej części pracy gen *rv3907c* będzie określany jako gen *cca*, a jego produkt jako nukleotydylotransferaza tRNA (CCA_{Mtb}).

5.2 Identyfikacja roli białka CCA_{Mtb} w komórkach mykobakterii

W celu analizy funkcjonalnej genu *cca*, który jest niezbędny dla przeżycia prątków, skonstruowano rekombinowane szczepy *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* charakteryzujące się obniżonym poziomem białka CCA_{Mtb} oraz CCA_{Msm} w obecności induktora (aTc). Przygotowane szczepy z indukowaną deplecją badanych białek zostały wykorzystane do analiz wzrostu w warunkach laboratoryjnych, przeżywalności w obecności czynników mutagennych, a także dokonano globalnej oceny ich transkryptomu.

Na bazie wektorów pLJR965 i pLJR962 przygotowano rekombinowane plazmidy pozwalające na wyciszenie ekspresji genu *cca*. Do tego celu wykorzystano odpowiednie oligonukleotydy (Tabela 3.4.), komplementarne do badanego genu w sąsiedztwie sekwencji PAM, które poddano reakcji hybrydyzacji. Uzyskane dwuniciowe sekwencje łączy z DNA plazmidu pLJR962 dla szczepu *M. smegmatis* oraz pLJR965 dla szczepu *M. tuberculosis*, liniowanego poprzez trawienie enzymem BsmBI. Prawidłowość konstrukcji rekombinowanych plazmidów weryfikowano poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera w celu sprawdzenia poprawności klonowanej sekwencji a następnie wprowadzano do komórek *M. smegmatis* mc² 155 lub *M. tuberculosis* H37Rv. Z uzyskanych transformantów izolowano DNA chromosomalny i potwierdzano integrację plazmidów z chromosomalnym DNA badanych szczepów z wykorzystaniem metody PCR.

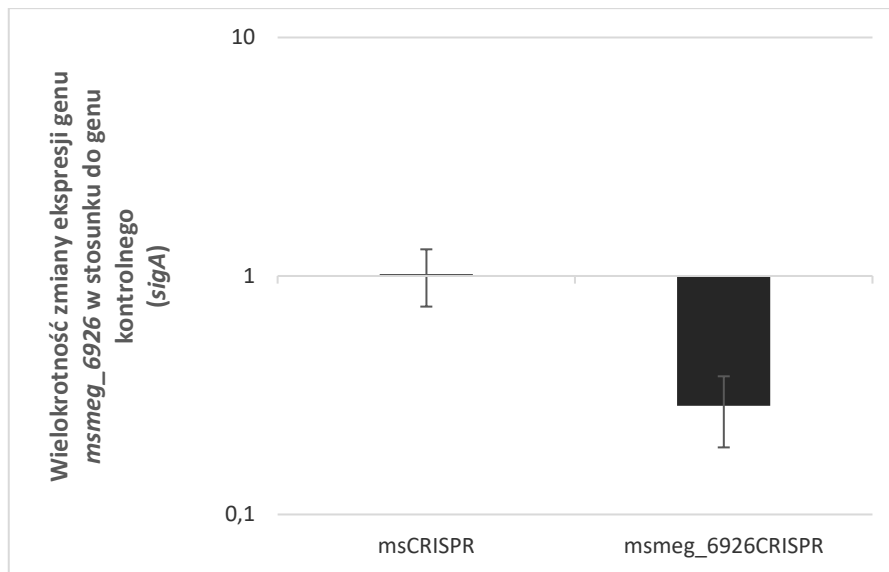
W rekombinowanych szczepach *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* rosnących w obecności chemicznego induktora, anhydrotetracykliny (100 ng aTc), oceniano poziom białka $CCA_{Mtb/Msm}$ metodą immunodetekcji Western blot z zastosowaniem króliczej surowicy odpornościowej anty- CCA_{Mtb} (Rycina 5.2.1).



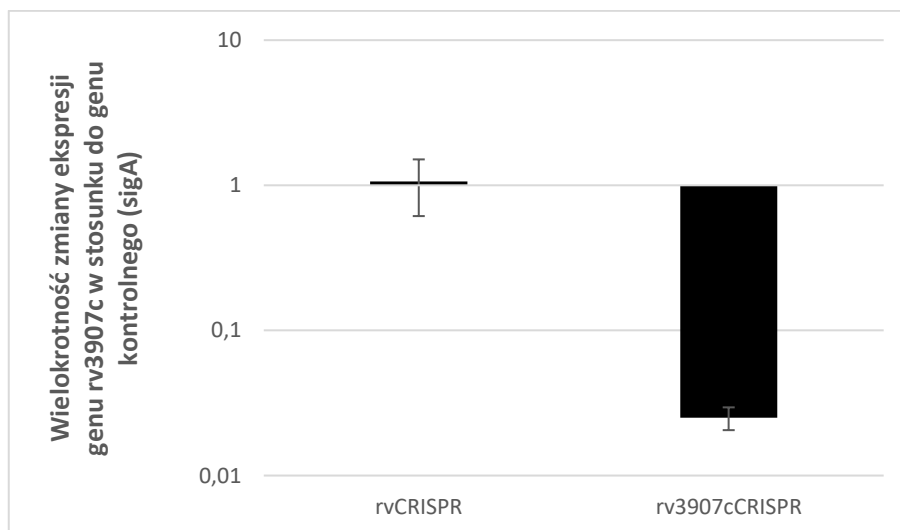
Rycina 5.2.1. Immunodetekcja białka CCA w komórkach *M. smegmatis*. (A) Analiza Western blot lizatów komórkowych szczepu kontrolnego *M. smegmatis* *ccaCas9* (B) Analiza Western blot lizatów komórkowych szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* *ccaCas9*. Dla detekcji białka zastosowano króliczą surowicę odpornościową anti-PNPaza (przeciwciała kontrolne) oraz anti-CCA. Obniżenie poziomu białka CCA_{Mtb/Ms} indukowano poprzez dodanie anhydrotetracykliny (aTc) we wskazanych stężeniach (20 – 100 ng/ml).

Poziom transkryptów dla genu *cca* wyznaczano w szczepach *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* zawierających wektor kontrolny (pLJR 962/pLJR 965) oraz w szczepach, do których wprowadzono rekombinowane plazmidy (CRISPR-Cas9-*cca*) w celu zablokowania ekspresji badanego genu. Wszystkie szczepy hodowano na podłożu 7H9/OADC z dodatkiem anhydrotetracykliny w stężeniu 100 ng/ml. Z komórek bakteryjnych znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu izolowano całkowity RNA, który przepisywano na cDNA z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję ilościowego PCR prowadzono wobec genu referencyjnego *sigA*.

A



B



Rycina 5.2.2. Ocena poziomu transkryptów dla genu $cca_{Mtb/Ms}$ metodą $qPCR$. Ocena poziomu transkryptów cca u szczepów kontrolnych CRISPR/Cas9 oraz mutantów $-cca_{Cas9}$ *M. smegmatis* (A) oraz *M. tuberculosis* (B) hodowanych z dodatkiem anhydrotetracykliny.

Zaobserwowano znacząco obniżony poziom transkryptów dla białka CCA u mutantów *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis cca_{Cas9}*, w stosunku do szczepów niosących kontrolny wektor pLJR962 lub pLJR965 (Rycina 5.2.2).

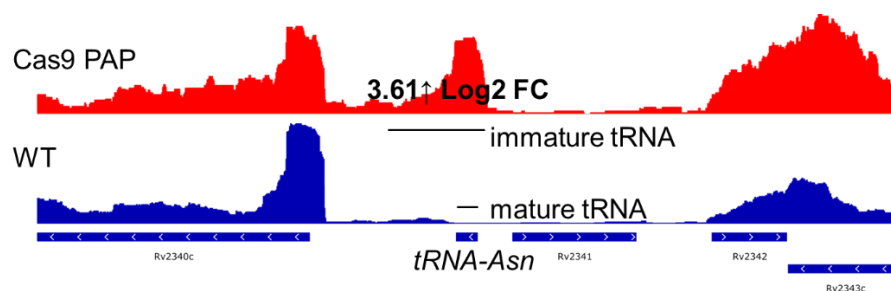
Efekt zahamowania wzrostu zaobserwowano także dla szczepu *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem CCA_{Mtb} rosnącym na podłożu, bogatym, mineralnym, w niskim

pH a także w warunkach hipoksji (dr E. Błaszczuk-praca doktorska). Powyższe wyniki jednoznacznie wykazały, że uzyskane rekombinowane szczepy mykobakterii charakteryzują się indukowanym w obecności aTc zahamowaniem ekspresji genu *cca* oraz syntezy białka $CCA_{Mtb/Msm}$ co prowadzi do silnego zahamowania ich wzrostu w warunkach *in vitro*.

5.3 Globalna analiza transkryptomyczna mykobakterii z obniżonym poziomem ekspresji genu *cca*_{Mtb}

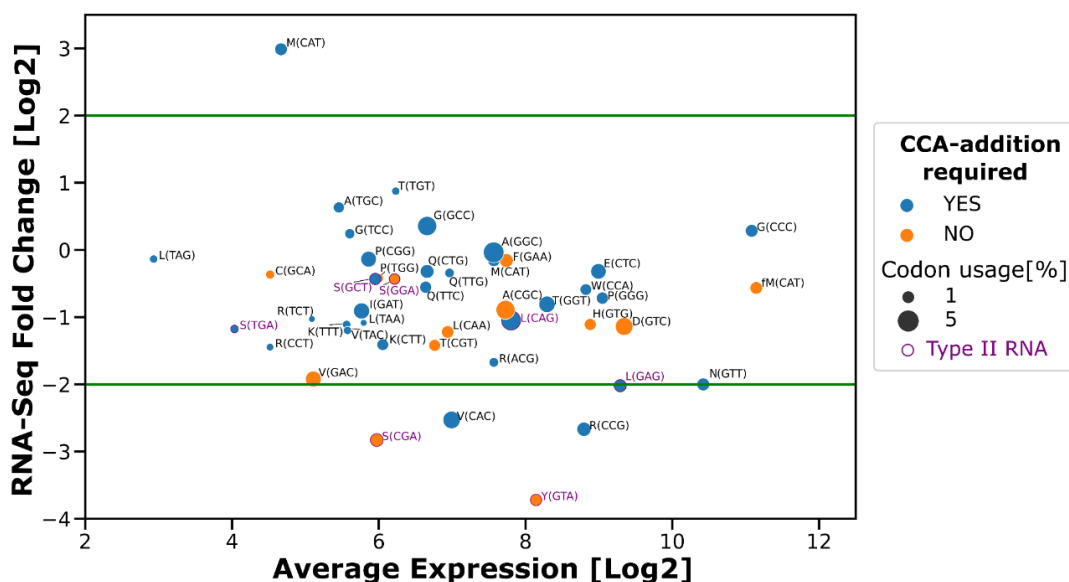
Całkowity RNA izolowany z komórek szczepu kontrolnego *M. tuberculosis* oraz z obniżoną ekspresją *cca* poddawano analizie jakości z użyciem Cheap Agilent RNA 6000 Nano przy użyciu aparatu BioAnalyzer. Dobrej jakości preparaty RNA, o ocenie integralności powyżej 8 (RIN- RNA Integrity Number) poddano globalnemu sekwencjonowaniu RNASeq (we współpracy z mgr Marcinem Słomką; BioBank, UŁ).

Analiza danych uzyskanych z sekwencjonowania transkryptomu szczepu dzikiego i mutantu $CCA_{MtbCas9}$ wykazała akumulację u mutantu 18 rodzajów tRNA (z 45 wszystkich rodzajów identyfikowanych u *M. tuberculosis*). Dojrzałe cząsteczki tRNA posiadają długość około 80 nukleotydów i są eliminowane w procesie przygotowywania biblioteki RNA. Obserwowana akumulacja dotyczyła więc dłuższych, niedojrzałych cząsteczek tRNA, które akumulowały się wyłącznie w szczepach z upośledzoną ekspresją genu *cca*. Szczegółowa analiza akumulowanych transkryptów tRNA wskazywała na brak obróbki zarówno ich 5' jak i 3' końca co można tłumaczyć ściśle określoną kolejnością dojrzewania tRNA u bakterii (Rycina 5.3.1). Ponadto niedojrzałe cząsteczki tRNA, które nagromadziły się po obniżeniu poziomu ekspresji CCA_{Mtb} , były silnie poliadenylowane. Ogony poli(A) obserwowane na 3' końcu transkryptu charakteryzowały się różną długością i niejednorodnością związaną z insercją przypadkowych nukleotydów, innych niż adeninowe.



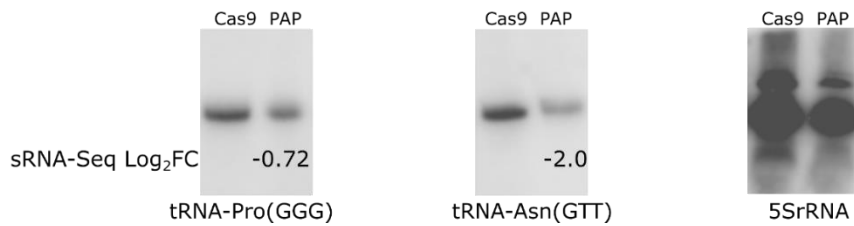
Rycina 5.3.1. Akumulacja niedojrzałych cząsteczek tRNA-Asn u mutantu PAPI CRISPR/Cas9.

W celu analizy dojrzałych cząsteczek tRNA, całkowity RNA izolowany z komórek prątków użyto do przygotowania bibliotek dedykowanych dla małych cząsteczek RNA (TrueSeq Small RNA Library, Illumina). Uzyskane biblioteki poddano analizie jakości a następnie sekwencjonowano w systemie Illumina. Ocenę ekspresji genów zawężono do niekodujących RNA, z wyłączeniem rRNA. Analiza takich bibliotek ujawniła 20 zmian przy porównywaniu szczepu z obniżonym poziomem białka CCA_{Mtb} ze szczepem kontrolnym niosącym kontrolny wektor Cas9 ($\text{Log}_2\text{FC} = |1,583|$; $p > 0.05$). Wśród tych zmian 6 było związanych z tRNA z widocznym zmniejszeniem ilości dojrzałego tRNA-Met (MetV, CAT) i akumulacją tRNA-Ser (SerX, CGA), tRNA-Tyr (TyrT, GTA) i tRNA-Arg (ArgV, CCG), tRNA-Ser (SerU, TGA), tRNA-Val (ValT, CAC) (Ryc. 5.3.2).



Rycina 5.3.2. Analiza poziomu cząsteczek tRNA w szczepie $ccaMtbCas9$. Zróżnicowana ekspresja wszystkich rodzajów tRNA w oparciu o sekwencjonowanie małego RNA.

Ilościową analizę wybranych tRNA w komórkach szczepu z obniżonym poziomem CCA_{Mtb} i szczepie kontrolnym przeprowadzono także z wykorzystaniem techniki hybrydacji typu Northern Blot. Całkowity RNA rozdzielano w żelu agarozowym, a następnie po transferze na membrany nylonowe hybrydowano z odpowiednimi sondami rozpoznającymi badane cząsteczki tRNA (Ryc. 5.3.3).

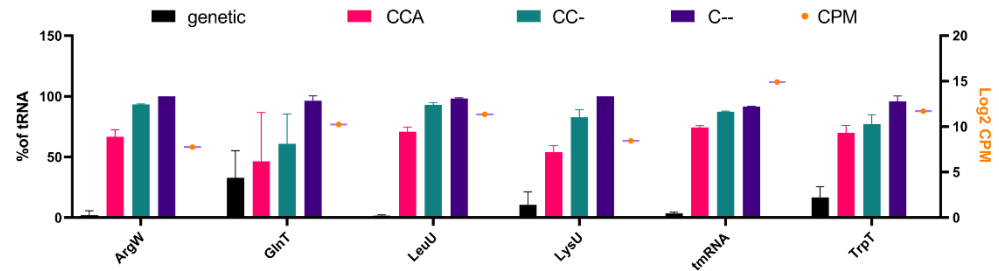


Rycina 5.3.3. Ocena ilościowa wybranych tRNA w komórkach mykobakterii. Detekcja tRNA została przeprowadzona z wykorzystaniem hybrydyzacji Northern blot dla tRNA-Pro, tRNA-Asn, 5s rRNA.

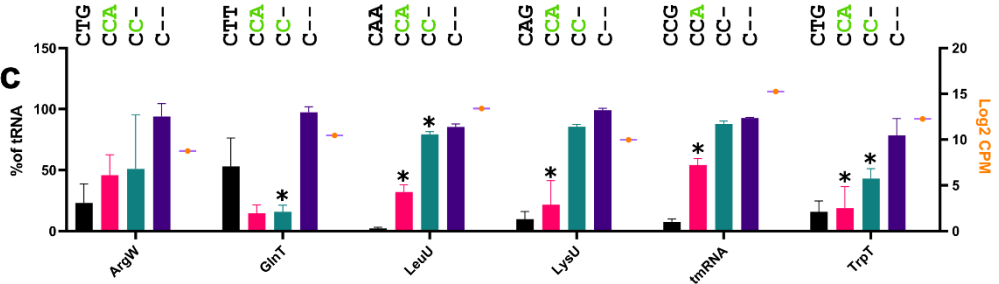
Analiza wybranych cząsteczek tRNA potwierdziła zmianę poziomu dla wybranych tRNA obserwowaną podczas analizy danych uzyskanych z sekwencjonowania RNA (RNASeq) u mykobakterii z obniżonym poziomem ekspresji *cca*.

Akumulacja niedojrzałych cząsteczek tRNA oraz deplecja lub akumulacja tRNA o spodziewanym zakresie długości w komórkach z obniżonym poziomem CCA_{Mtb} wskazywały na zależne od obecności białka CCA_{Mtb} zahamowanie procesu dojrzewania tRNA. Ze względu na spodziewaną aktywność enzymu CCA_{Mtb} , tRNA identyfikowane w procesie sekwencjonowania małych bibliotek RNA, analizowano pod kątem obecności terminalnej sekwencji CCA. Przeprowadzone analizy jednoznacznie wykazały zwiększoną obecność cząsteczek tRNA pozbawionych terminalnej sekwencji CCA w komórkach z ograniczoną ilością białka CCA_{Mtb} (Rycina 5.3.3.).

Cas9



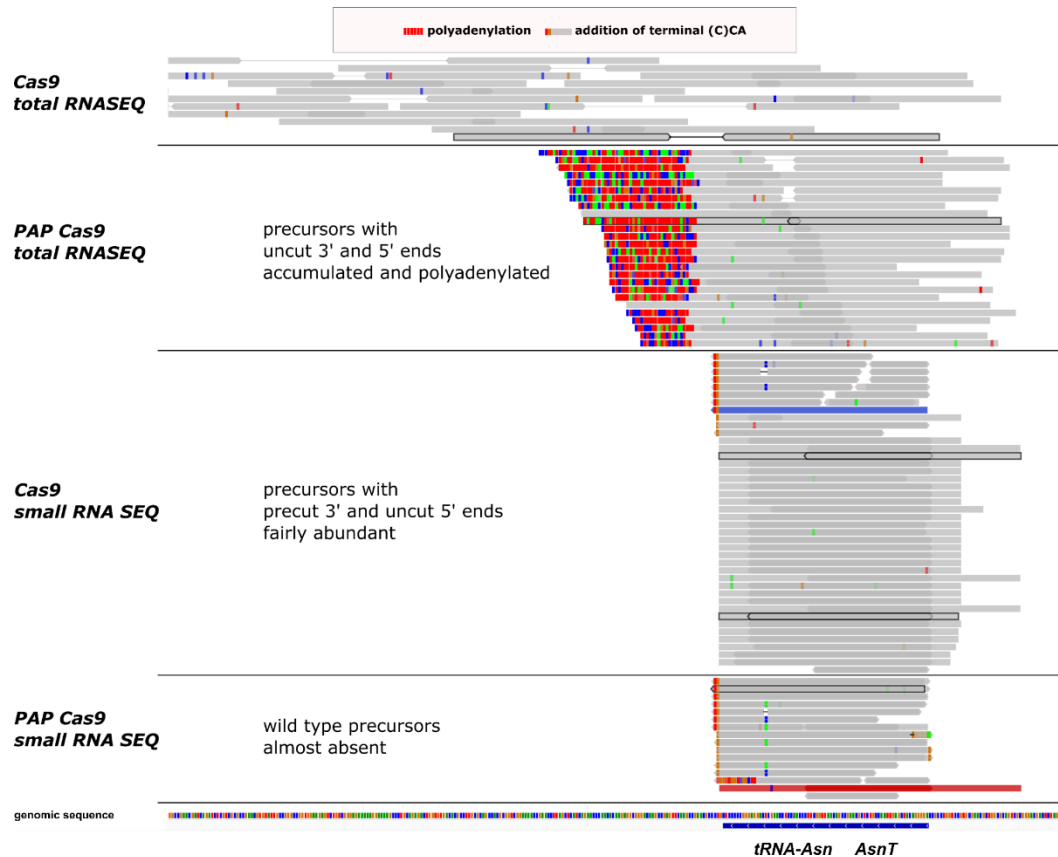
Cas9 Rv3907c



Rycina 5.3.4. Analiza obecności terminalnej sekwencji CCA po obniżeniu ekspresji *ccaMtb*. Kwantyfikacja rodzajów tRNA na podstawie sekwencjonowania małego RNA szczepu kontrolnego Cas9 (A) i szczepu z obniżonym poziomem *ccaMtb* (B). Sekwencje (reads) zawierające CCA, CC i C określono ilościowo i wykreślono (lewa oś) wraz z wartościami Log₂ CPM (prawa oś) dla każdego wybranego tRNA i dla tmRNA. Wartości CPM są przedstawiane jako pomarańczowe kropki. Wartość $p \leq 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

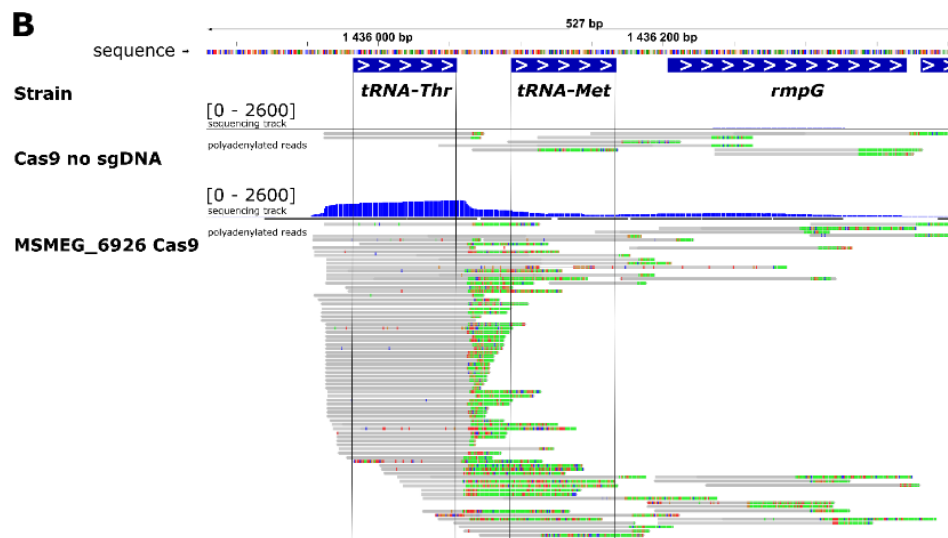
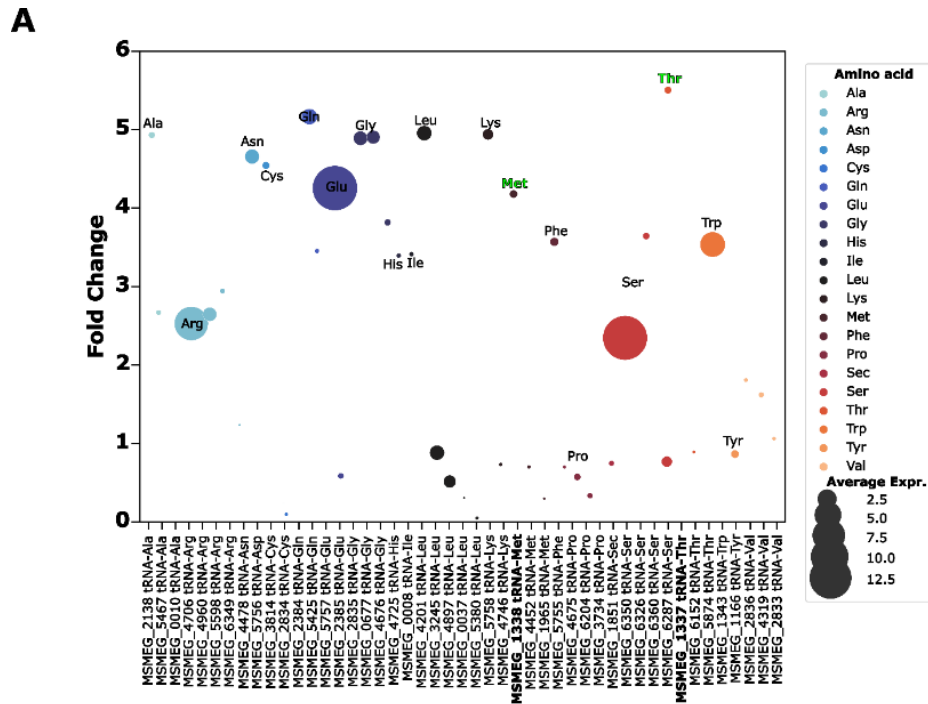
Standardowo, podczas analizy transkryptomów bakteryjnych nie obserwuje się dużych ilości poliadenylowanych transkryptów. Jednakże analiza transkryptomów dla szczepu *M. tuberculosis* charakteryzującego się obniżonym poziomem enzymu *CCA_{Mtb}* pozwoliła nie tylko zaobserwować akumulację niedojrzałych cząsteczek tRNA, ale także zjawisko bardzo wydajnej poliadenylacji dotyczącej nie tylko cząsteczek tRNA (Rycina 5.3.5). Enzymem, który oprócz polimerazy poli(A), może być odpowiedzialny za proces poliadenylacji w komórkach bakteryjnych jest PNPaza (nukleotydylotransferaza polinukleotydowa) kodowana przez *gps1*. W celu zbadania czy za obserwowane zjawisko poliadenylacji transkryptów przy niedoborach enzymu *CCA_{Mtb}* u mykobakterii odpowiada PNPaza, przygotowano z wykorzystaniem techniki CRISPR-Cas9, szczep o obniżonej ekspresji równocześnie dwóch genów, *cca* oraz *gps1*. Całkowity RNA z uzyskanego szczepu, oraz przygotowany wcześniej w naszym laboratorium szczep CRISPR-*gps1* (Płociński i wsp. 2019), zostały poddane sekwencjonowaniu, wykazując, że zjawisko poliadenylacji transkryptów obserwowane jest wyłącznie dla szczepu o obniżonym poziomie enzymu *CCA_{Mtb}*, ale tylko w obecności niezaburzonej ekspresji

genu *gps1*. Powyższe analizy jednoznacznie wykazały, że za obserwowane zjawisko poliadenylacji przy niedoborach CCA_{Mtb} odpowiada enzym PNPaza.



Rycina 5.3.5. Poliadenylacja cząsteczek tRNA *in vivo* związana z obniżeniem ekspresji CCA_{Mtb}. Reprezentatywne sekcje sekwencjonowania zwizualizowane za pomocą Integrative Genomic Viewer przedstawiono w panelach poziomych dla całkowitego RNASEQ i małego RNASEQ, dla szczepu kontrolnego niosącego kontrolny plazmid Cas9 oraz dla szczepu *cca_{Cas9}*. Mapa typu i rozkładu odczytu transkryptomcznego dopasowana do sekwencji genomowej w pobliżu regionu kodującego tRNA-Asn(GTT) jako przykład akumulacji poliadenylowanych nieprzetworzonych form tRNA.

Zależność pomiędzy deplecją białka CCA a poliadenylacją transkryptów analizowano także dla komórek *M. smegmatis* z obniżoną ekspresją genu *cca*. W tej analizie dodatkowo przeprowadzono wzbogacanie frakcji poliadenylowanych z wykorzystaniem kulek pokrytych oligo-dT. Przeprowadzone analizy pozwoliły na uwidocznienie niewielkiej frakcji poliadenylowanych RNA w komórkach kontrolnych oraz bardzo intensywną poliadenylację w komórkach bakterii z obniżonym poziomem CCA_{Msm} (Rycina 5.3.6.).



Rycina 5.3.6. Zmiana (Log2) dla wzbogacenia cząsteczek tRNA w bibliotekach cDNA wytworzonych z RNA wstępnie wyselekcjonowanego na kulkach oligo-poli-dT z kontrolnego szczepu *M. smegmatis* niosącego wektor Cas9 i Msmeg_6926 (*cca*) szczep Cas9 z obniżoną ekspresją CCA_{Msm} (A). Sekwencjonowanie pokazujące przykładową poliadenylację transkryptów kodujących tRNA-Thr i tRNA-Met z dodatkowymi resztami adeniny pokazanymi na zielono (B). Wyniki sekwencjonowania zmodyfikowano w Integrative Genomic Viewer (IGV).

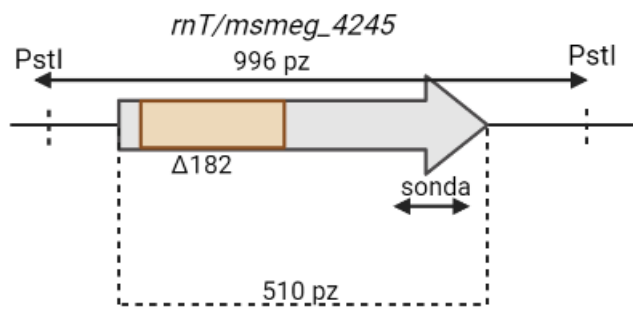
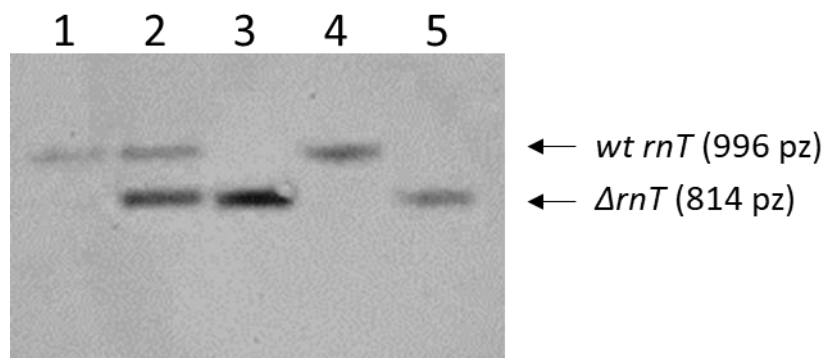
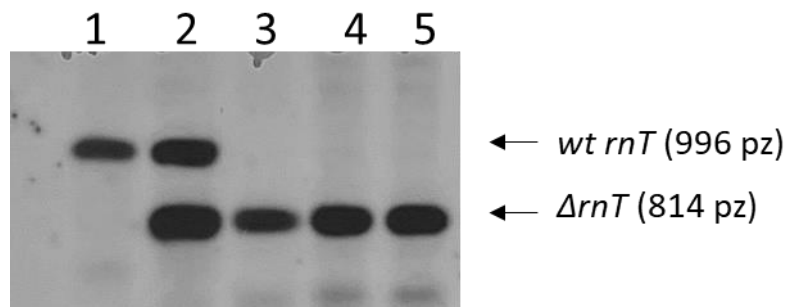
Wzbogacenie poliadenylowanej frakcji RNA na kulkach oligo-poli-dT pozwoliło na detekcję niewielkiej liczby poliadenylowanych transkryptów w szczepie kontrolnym z fizjologicznym poziomem białka CCA_{Msm} . W szczepie mutancie z obniżonym poziomem CCA_{Mtb} obserwowano akumulację poliadenylowanych transkryptów, które nie ograniczały się do niedojrzałych cząsteczek tRNA. Obfitą poliadenylację transkryptów

obserwowano także dla takich niekodujących RNA jak *mcr3*, *MTS1338*, *rnpB*, oraz dla regionów międzygenowych występujących poniżej genów *rv1534* and *rv3198c*. Przeprowadzone analizy transkryptomyczne dla szczepu z obniżonym poziomem $CCA_{Mtb/Msm}$ jednoznacznie wykazały zaburzenie procesu dojrzewania tRNA objawiające się akumulacją defektywnych, pozbawionych terminalnej sekwencji CCA cząsteczek tRNA ulegających procesowi poliadenylacji zależnej od PNPazy.

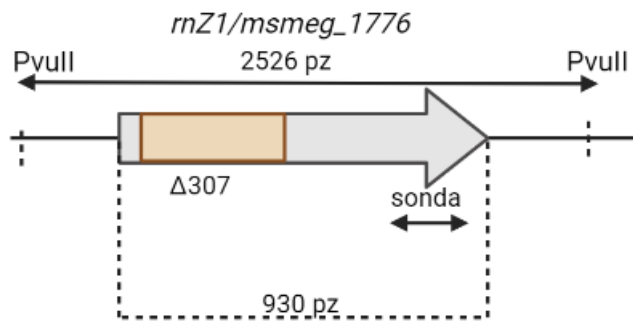
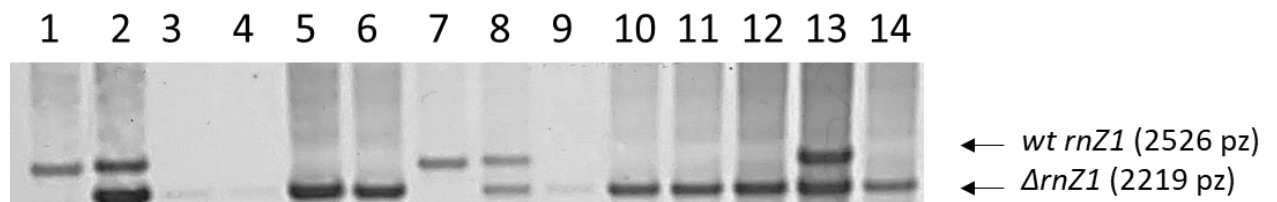
5.4. Poszukiwanie enzymów o aktywności egzonukleolitycznej/ endonukleolitycznej zaangażowanych w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii

U bakterii enzymami zaangażowanymi w dojrzewanie 3' końca tRNA są egzonukleazy z nadrodziny DnaQ. Nadrodzina ta jest strukturalnie konserwowaną grupą egzonukleaz 3'-5', które katalizują wycinanie monofosforanów nukleozydów na końcach DNA lub RNA w kierunku 3'-5'. Nadrodzina DnaQ jest również nazywana nadrodziną DEDD, od czterech konserwatywnych reszt aminokwasowych obecnych w miejscu katalitycznym. Nadrodzina DnaQ składa się z enzymów przetwarzających DNA i RNA, takich jak domeny korekcyjne polimeraz DNA, inne egzonukleazy DNA, RNaza D, RNaza T, oligorybonukleaza i egzonukleazy RNA. Analiza bioinformatyczna (KEGG) pozwoliła na identyfikację w proteomie *M. tuberculosis* czterech (*Rv1340* – RNazaPH; *Rv2179c* – RNaza T; *Rv2407* – RNaza Z; *Rv2681* – RNaza D) a w proteomie *M. smegmatis* pięciu (*Msmeg_4568* – RNaza Z1; *Msmeg_1776* – RNaza Z2; *Msmeg_4901* – RNaza PH; *Msmeg_2778* – RNaza D; *Msmeg_4245* – RNaza T) RNaz z nadrodziny DEDD. Dane literaturowe dostępne dla innych gatunków drobnoustrojów oraz globalna mutageneza transpozonowa *M. tuberculosis* wskazują, że geny kodujące ww. białka nie są niezbędne u *M. tuberculosis* i innych gatunków bakterii. Dlatego też w celu zbadania roli ww. białek u mykobakterii postanowiono skonstruować pojedyncze i wielokrotne mutanty *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych egzonukleaz z nadrodziny DnaQ. Do konstrukcji mutantów wykorzystano proces wymiany genów z zastosowaniem homologicznej rekombinacji (Metody 4.22 – 24). Skonstruowano rekombinowane plazmidy niezdolne do replikacji w komórkach mykobakterii noszące geny zawierające

wewnętrzne delecje a następnie wprowadzono je do komórek *M. smegmatis* i poprzez odpowiednią selekcję, identyfikowano mutanty pozbawione funkcjonalnych genów kodujących *rnPH*, *rnT*, *rnZ1*, *rnZ2*, *rnD*. Mutanty pozbawione funkcjonalnej kopii genu kodującego jeden z badanych enzymów były następnie wykorzystane w procesie rekombinacji dla pozyskania mutantów wielokrotnych pozbawionych równocześnie więcej niż jednego z badanych genów. Genotyp wszystkich konstruowanych mutantów był na każdym etapie weryfikowany poprzez metodę amplifikacji DNA *in vitro* oraz hybrydyzację typu Southern (Rycina 5.4.1 – 5.4.5). Konstruowane plazmidy zamieszczono w Tabeli 3.6.1.

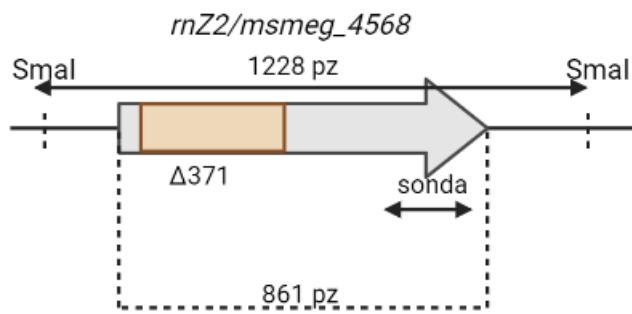
A**B****C**

Rycina 5.4.1. Analiza genotypu mutantów *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Southern blot. (A) Schemat przedstawiający locus dla genu *rnT*. Na schemacie zaznaczono miejsca restrykcyjne wykorzystane w procesie trawienia chromosomalnego DNA, wewnętrzną delecję, oraz sondę genetyczną, (B) Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy T. Chromosomalny DNA trawiono enzymem PstI. Strzałkami zaznaczono sygnał wskazujący na obecność funkcjonalnego genu (*wt*) oraz genu z wewnętrzną delecją (*ΔrnT* – pomarańczowy prostokąt). Linia 1 – szczep typu „dzikiego”, 2 – SCO, 3 – mutant DCO, 4- mutant DCO typu „dzikiego”, 5 – mutant DCO. (C) Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy PH oraz RNazy T. Chromosomalny DNA trawiono enzymem PstI. Linia 1 – szczep typu „dzikiego”, 2 – SCO, 3 - 5 – mutant *rnPHT* DCO.

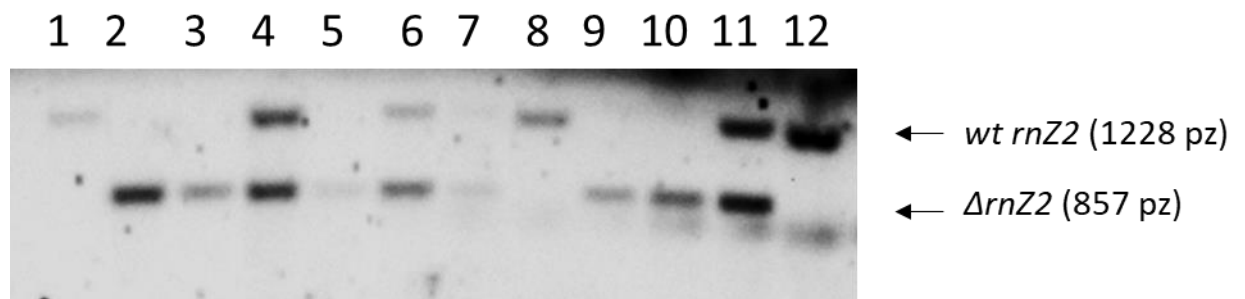
A**B**

Rycina 5.4.2. Analiza genotypu mutantów *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Southern blot. (A) Schemat przedstawiający locus dla genu *rnZ1*. Na schemacie zaznaczono miejsca restrykcyjne wykorzystane w procesie trawienia chromosomalnego DNA, wewnętrzną delecję, oraz sondę genetyczną. (B) Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy Z1. Chromosomalny DNA trawiono enzymem PvuII. Strzałkami zaznaczono sygnał wskazujący na obecność funkcjonalnego genu (wt) oraz genu z wewnętrzną delecją ($\Delta rnZ1$ – pomarańczowy prostokąt). Linia 1 – szczerp typu „dzikiego”, 2 – SCO, 3 – $\Delta rnZ1$ DCO1, 4 – $\Delta rnZ1$ DCO2, 5 – $\Delta rnZ1$ DCO3, 6 – $\Delta rnZ1$ DCO4, 7 – szczerp typu „dzikiego”, 8 – SCO, 9 – $\Delta rnPHZ1$ DCO1, 10 – $\Delta rnPHZ1$ DCO2, 11 – $\Delta rnPHZ1$ DCO3, 12 – $\Delta rnPHZ1$ DCO4, 13 – SCO, 14 – $\Delta rnPHTZ1$ DCO1.

A

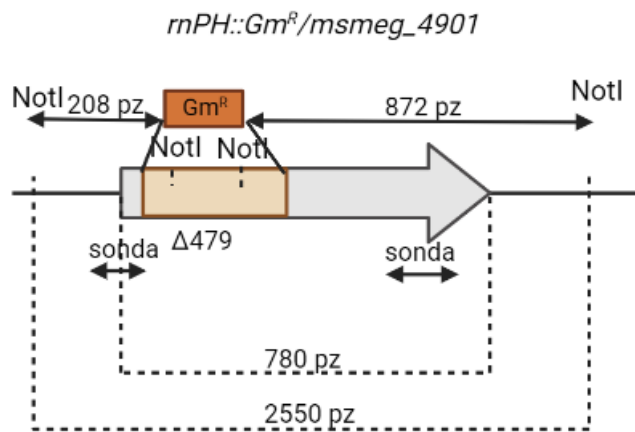


B

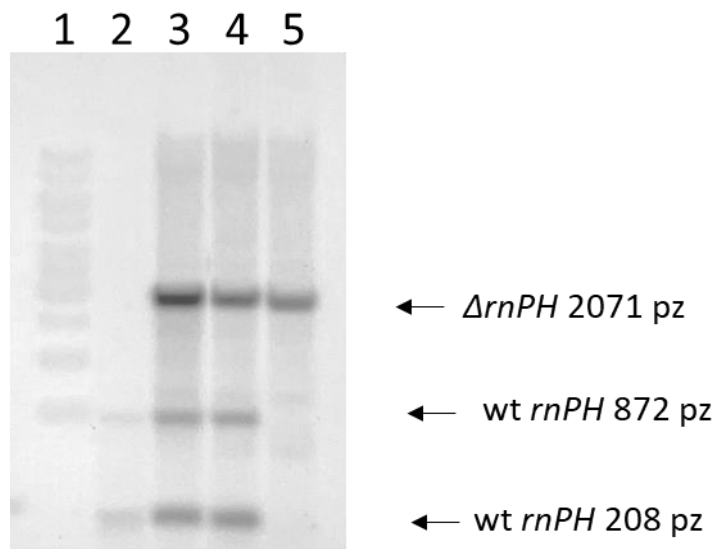


Rycina 5.4.3. Analiza genotypu mutantów *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Southern blot. (A) Schemat przedstawiający locus dla genu *rnZ2*. Na schemacie zaznaczono miejsca restrykcyjne wykorzystane w procesie trawienia chromosomalnego DNA, wewnętrzną delecję, oraz sondę genetyczną. (B) Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy Z2. Chromosomalny DNA trawiono enzymem *SmaI*. Strzałkami zaznaczono sygnał wskazujący na obecność funkcjonalnego genu (wt) oraz genu z wewnętrzną delecją ($\Delta rnZ2$ – pomarańczowy prostokąt). Linia 1 – szczep typu „dzikiego”, 2 – $\Delta rnZ2$ DCO1, 3 – $\Delta rnZ2$ DCO2, 4 – SCO, 5 – $\Delta rnPHTZ2$ DCO1, 6 – SCO, 7 – SCO, 8 – szczep typu „dzikiego”, 9 – $\Delta rnZ1Z2$ DCO1, 10 – $\Delta rnZ1Z2$ DCO2, 11 – SCO, 12 – szczep typu dzikiego.

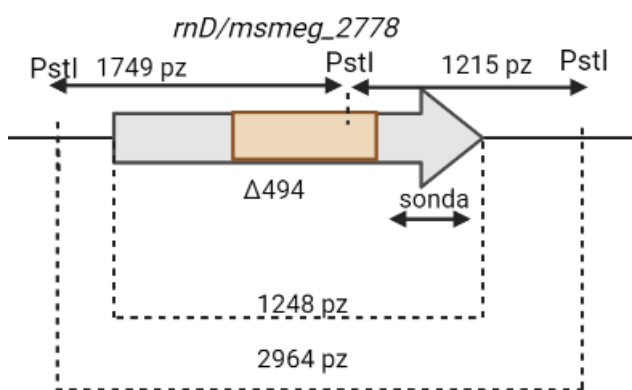
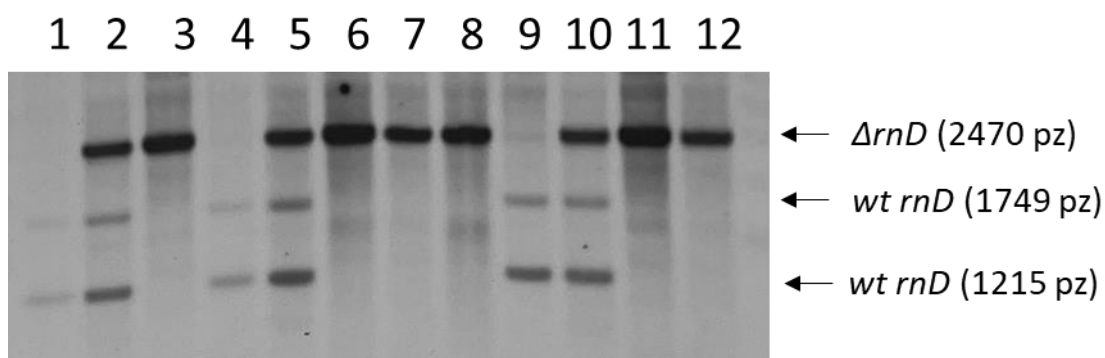
A



B



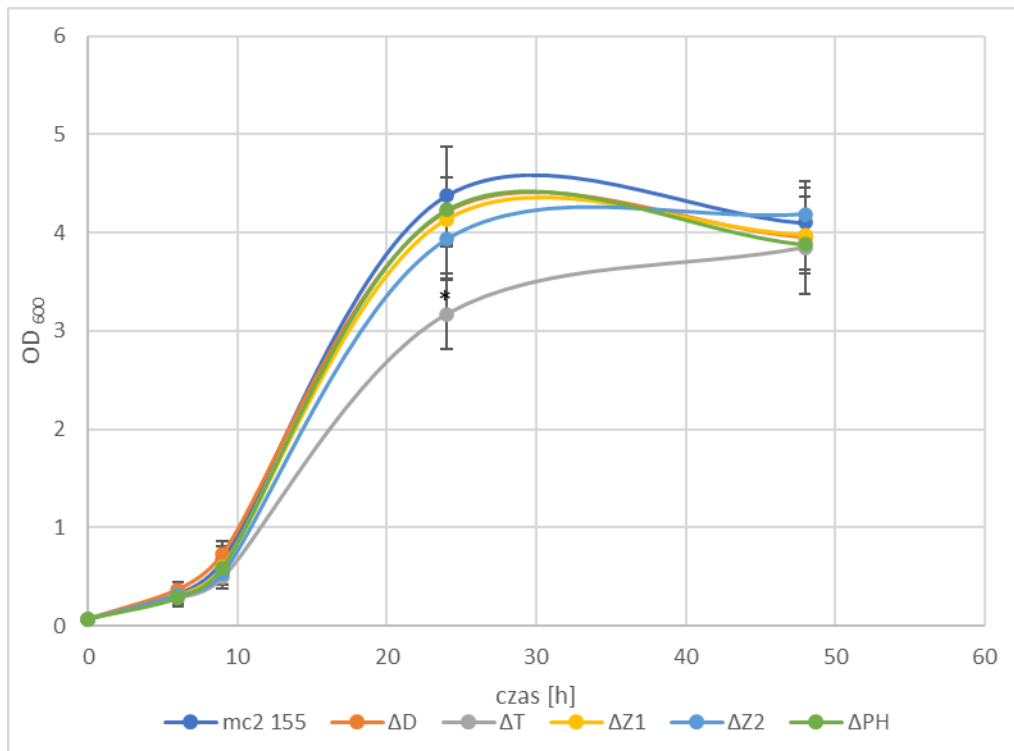
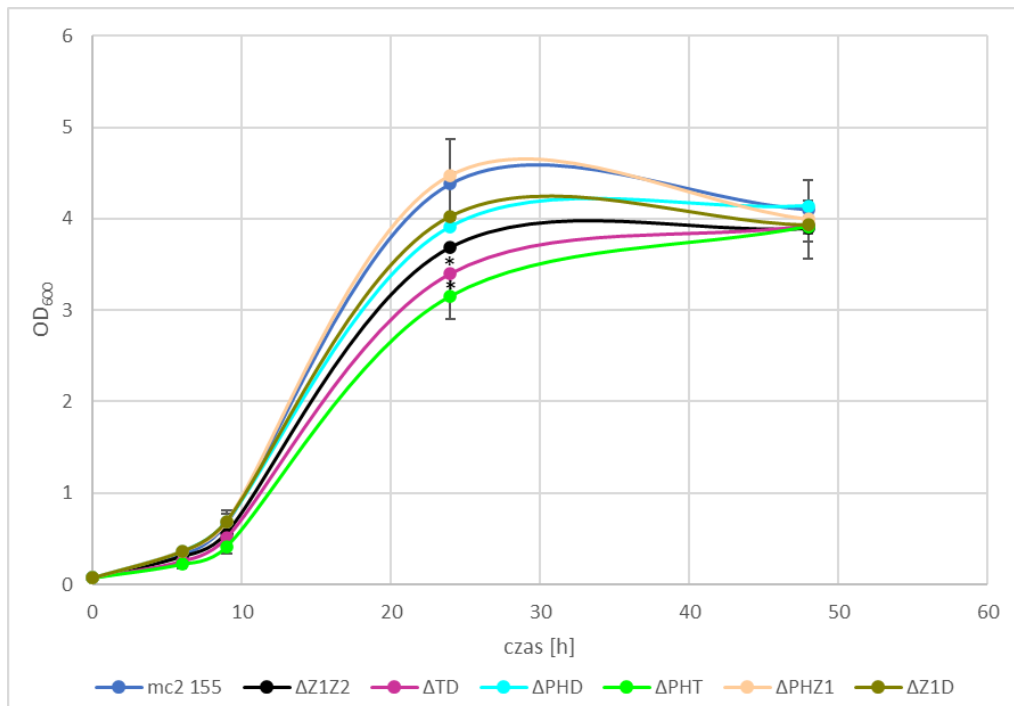
Rycina 5.4.4. Analiza genotypu mutantów *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Southern blot. (A) Schemat przedstawiający locus dla genu *rnPH*. Na schemacie zaznaczono miejsca restrykcyjne wykorzystane w procesie trawienia chromosomalnego DNA, wewnętrzną delecję, oraz sondę genetyczną (A). Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy PH. Chromosomalny DNA trawiono enzymem NotI. Strzałkami zaznaczono sygnał wskazujący na obecność funkcjonalnego genu (wt) oraz genu z wewnętrzną delecją ($\Delta rnPH$ – pomarańczowy prostokąt). Linia 1 – marker wielkości 1 kb; 2 – szczep typu „dzikiego”; 3 i 4- SCO; 5 – $\Delta rnPH$ DCO.

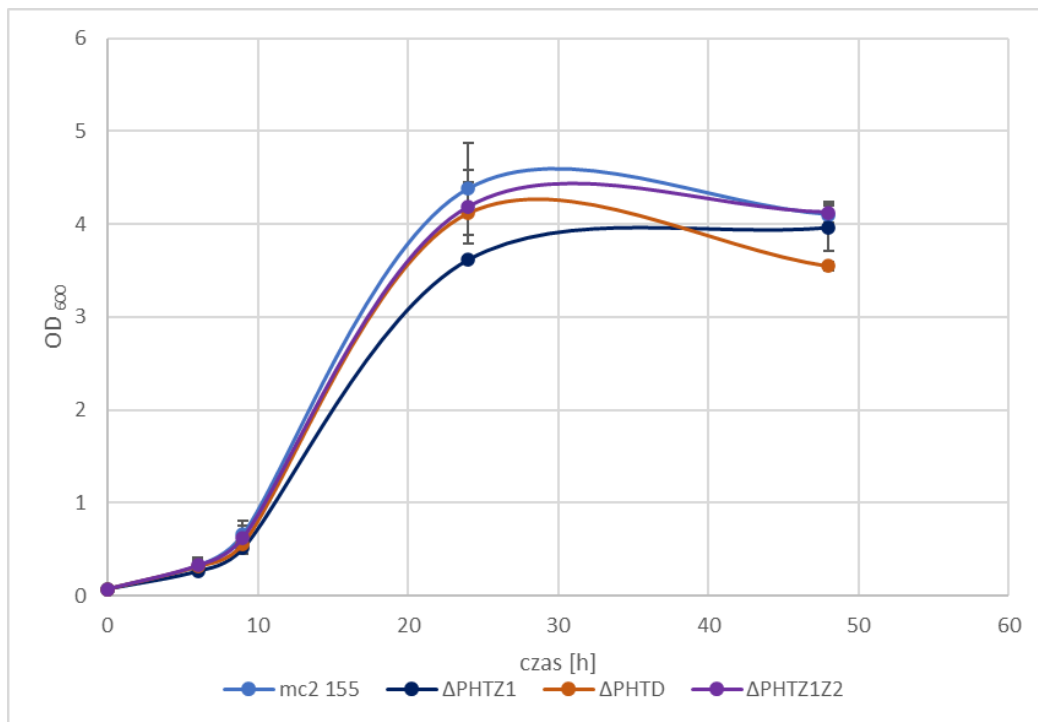
A**B**

Rycina 5.4.5. Analiza genotypu mutantów *M. smegmatis* z wykorzystaniem hybrydyzacji typu Southern blot. (A) Schemat przedstawiający locus dla genu *rdD*. Na schemacie zaznaczono miejsca restrykcyjne wykorzystane w procesie trawienia chromosomalnego DNA, wewnętrzną delecję, oraz sondę genetyczną. (B) Analiza potencjalnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnego genu dla RNazy D. Chromosomalny DNA trawiono enzymem PstI. Strzałkami zaznaczono sygnał wskazujący na obecność funkcjonalnego genu (wt) oraz genu z wewnętrzną delecją (ΔrdD – pomarańczowy prostokąt). Linia 1 – szczep typu „dzikiego”, 2 – SCO, 3 – $\Delta rnPHTD$ DCO1, 4 – szczep typu „dzikiego”, 5 – SCO, 6 – $\Delta rnPHD$ DCO1, 7 – $\Delta rnPHD$ DCO2, 8 – $\Delta rnPHD$ DCO3, 9 – szczep typu „dzikiego”, 10 – SCO, 11 – $\Delta rnTD$ DCO1, 12- $\Delta rnTD$ DCO2.

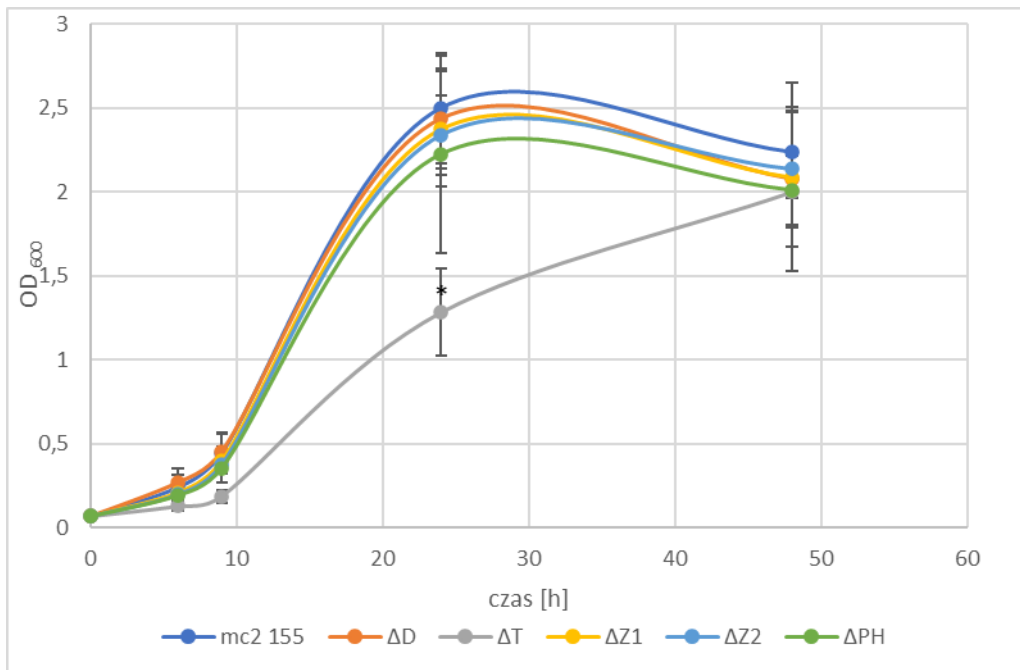
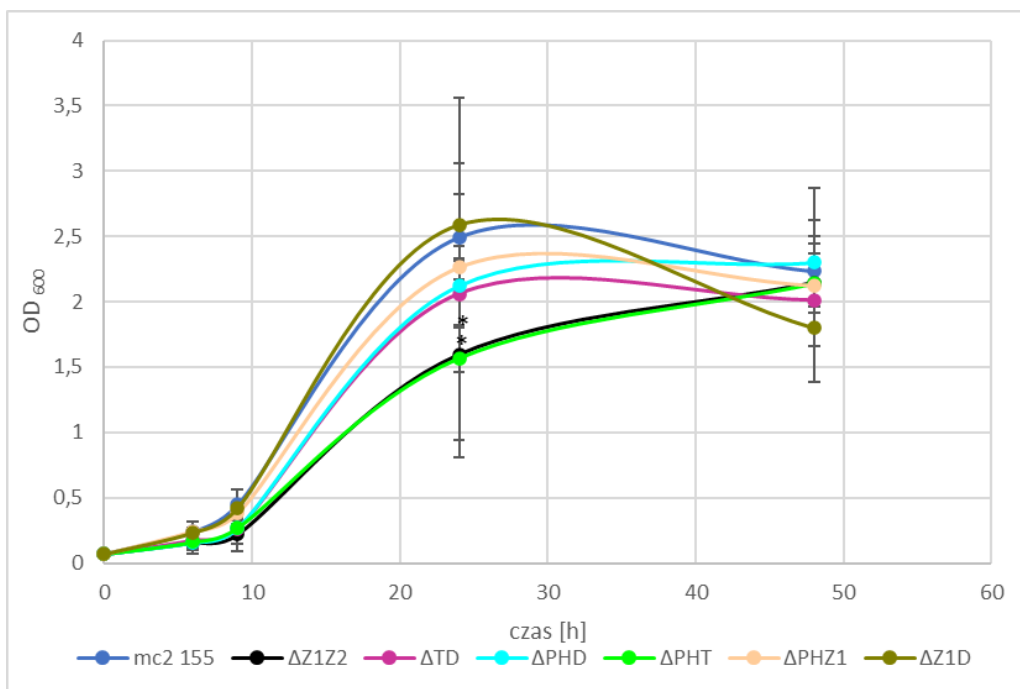
Aby zweryfikować, czy brak funkcjonalnych genów kodujących poszczególne RNazy wpływa na wzrost *M. smegmatis* dokonano analizy kinetyki wzrostu mutantów oraz szczepu kontrolnego poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli. Analizy wzrostu przeprowadzono na podłożu bogatym (7H9/OADC) oraz podłożu minimalnym z dodatkiem glicerolu lub cholesterolu jako jedyne źródła węgla.

Z przeprowadzonych analiz kinetyki wzrostu pojedynczych mutantów wynika, że wyłącznie mutant pozbawiony zdolności do syntezy funkcjonalnej RNazy T ($\Delta msmeg_4245$) wykazywał osłabiony wzrost na wszystkich rodzajach zastosowanych podłoży. Ponadto mutanty wielokrotne ($\Delta rnPHT$, $\Delta rnTD$, $\Delta rnPHTZ1$), pozbawione funkcjonalnej kopii genu kodującego RNazę T, charakteryzowały się również osłabionym wzrostem zarówno na podłożu bogatym jak i minimalnym (Rycina 5.4.6 – 5.4.8). Z drugiej strony, nie zaobserwowano osłabienia wzrostu dla mutantu wielokrotnego $\Delta rnPHTZ1Z2$, który był również pozbawiony funkcjonalnego genu $msmeg_4245$. Jedynym mutantem, który posiadał funkcjonalny gen dla RNazy T i charakteryzował się osłabionym wzrostem, ale wyłącznie na podłożu minimalnym z glicerolem lub cholesterolem, był podwójny mutant pozbawiony obu funkcjonalnych genów dla RNaz Z1 i Z2 (Rycina 5.4.7 i 5.4.8). W celu weryfikacji zależności pomiędzy brakiem funkcjonalnego genu dla RNazy T lub RNazy Z1/Z2 a osłabionym wzrostem, przygotowano szczepy skomplementowane funkcjonalnymi genami rnT i $rnZ1$, będącymi pod kontrolą własnej sekwencji promotorowej. W tym celu skonstruowano plazmidy integracyjne noszące wspomniane geny wraz z sekwencją promotorową i wprowadzono do mutantów ΔrnT i $\Delta rnZ1Z2$.

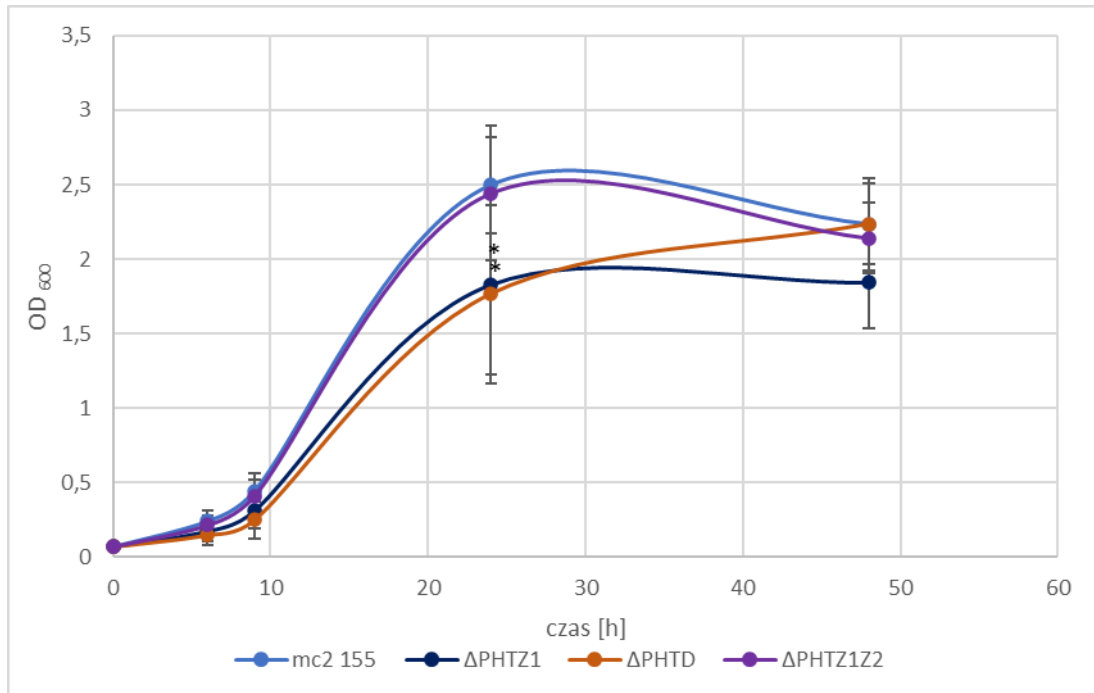
A**B**

C

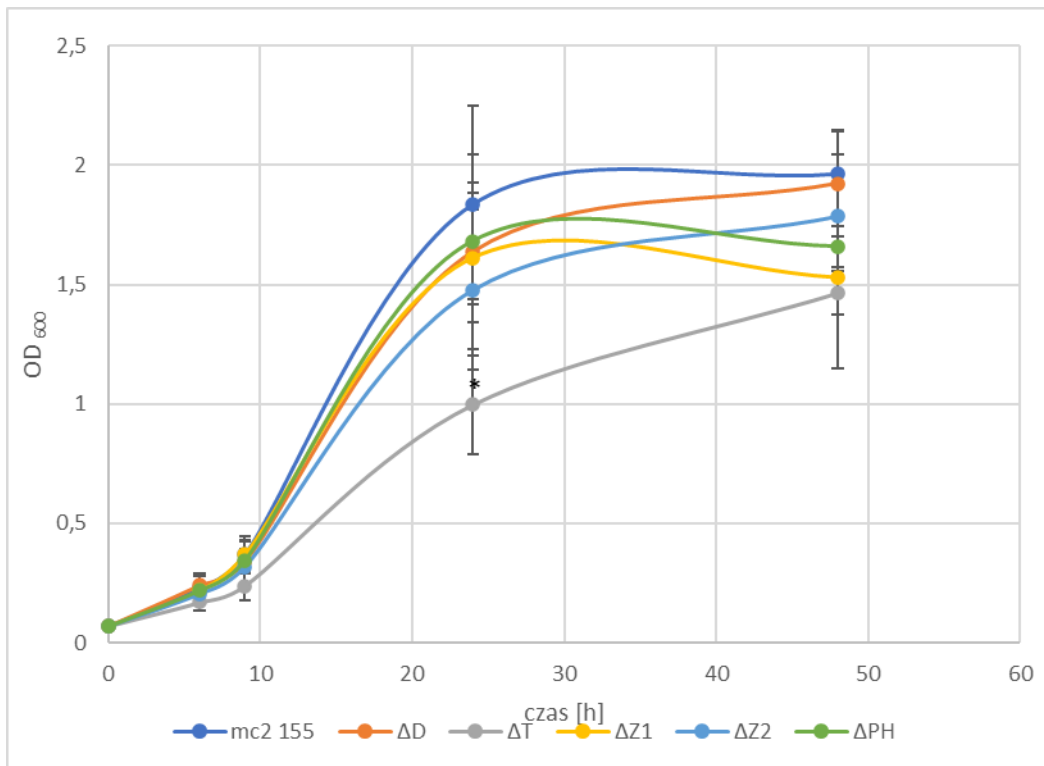
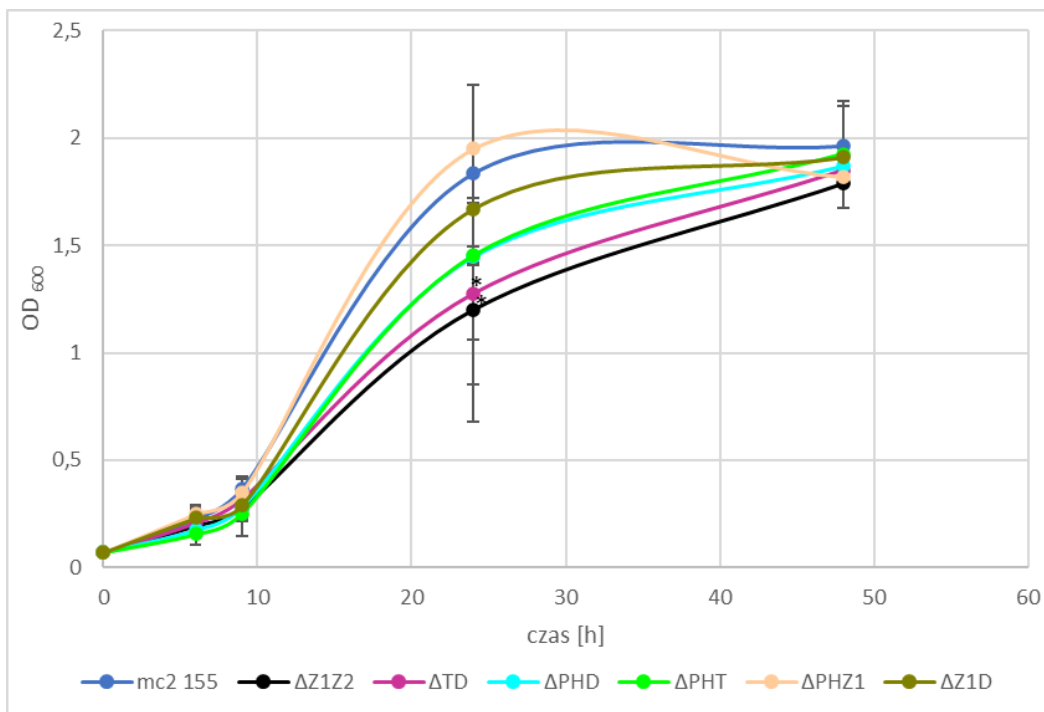
Rycina 5.4.6. Kinetyka wzrostu szczepu dzikiego oraz mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących egzonukleazy z nadrodziny DnaQ na podłożu 7H9/OADC. Panel (A) przedstawia wzrost pojedynczych mutantów (pozbawione odpowiednio RNazy D, RNazy T, RNazy Z1, RNazy Z2, RNazy PH); panel (B) wzrost podwójnych mutantów (pozbawionych RNazyZ1 oraz Z2; RNazy T oraz D, RNazy PH oraz D, RNazy PH oraz T; RNazy PH oraz Z1; RNazy Z1 oraz D); panel (C) wzrost wielokrotnych mutantów pozbawionych jednocześnie trzech funkcjonalnych genów (RNazy PH, RNazy T i RNazy Z1; a także RNazy PH, RNazy T i RNazy T; oraz czterech genów (RNazy PH, RNazy T, RNazy Z1 i Z2). Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą testu t-studenta, wykazano istotność statystyczną na poziomie $*p < 0,05$.

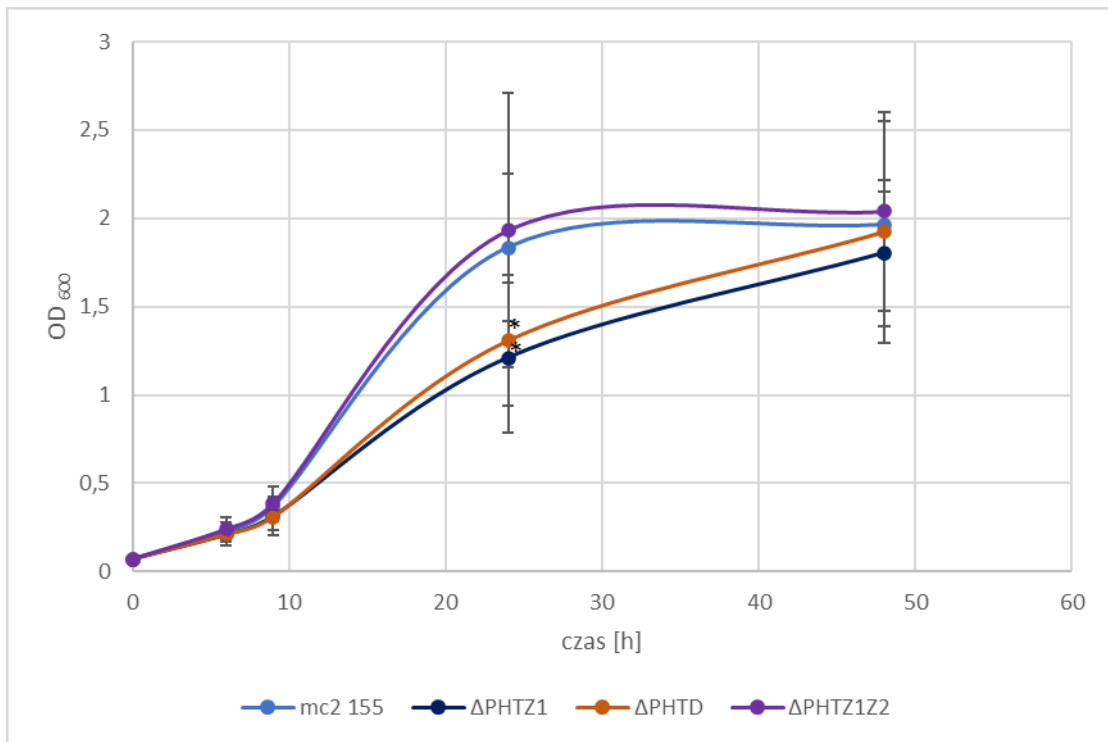
A**B**

C

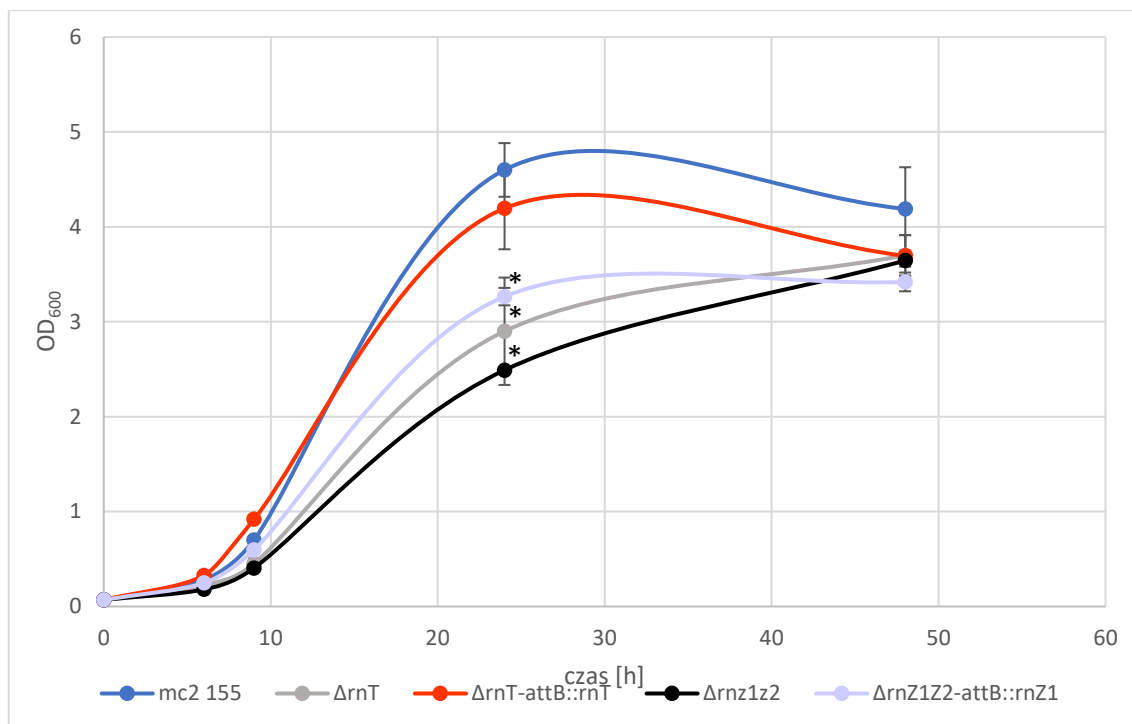


Rycina 5.4.7. Kinetyka wzrostu szczepu dzikiego oraz mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących egzonukleazy z nadrodziny DnaQ na podłożu minimalnym z glicerolem. Panel (A) przedstawia wzrost pojedynczych mutantów (pozbawione odpowiednio RNazy D, RNazy T, RNazy Z1, RNazy Z2, RNazy PH); panel (B) wzrost podwójnych mutantów (pozbawionych RNazyZ1 oraz Z2; RNazy T oraz D, RNazy PH oraz D, RNazy PH oraz T; RNazy PH oraz Z1; RNazy Z1 oraz D); panel (C) wzrost wielokrotnych mutantów pozbawionych jednocześnie trzech funkcjonalnych genów (RNazy PH, RNazy T i RNazy Z1; a także RNazy PH, RNazy T i RNazy T; oraz czterech genów (RNazy PH, RNazy T, RNazy Z1 i Z2). Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą testu t-studenta, wykazano istotność statystyczną na poziomie $*p < 0,05$.

A**B**

C

Rycina 5.4.8. Kinytyka wzrostu szczepu dzikiego oraz mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących egzonukleazy z nadrodziny DnaQ na podłożu minimalnym z cholesterolem. Panel (A) przedstawia wzrost pojedynczych mutantów (pozbawione odpowiednio RNazy D, RNazy T, RNazy Z1, RNazy Z2, RNazy PH); panel (B) wzrost podwójnych mutantów (pozbawionych RNazyZ1 oraz Z2; RNazy T oraz D, RNazy PH oraz D, RNazy PH oraz T; RNazy PH oraz Z1; RNazy Z1 oraz D); panel (C) wzrost wielokrotnych mutantów pozbawionych jednocześnie trzech funkcjonalnych genów (RNazy PH, RNazy T i RNazy Z1; a także RNazy PH, RNazy T i RNazy T; oraz czterech genów (RNazy PH, RNazy T, RNazy Z1 i Z2). Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą testu t-studenta, wykazano istotność statystyczną na poziomie $*p < 0,05$.



Rycina 5.4.9. Analiza kinetyki wzrostu mutantów ΔrnT i $\Delta rnZ1Z2$ oraz mutantów komplementowanych natywnym genem rnT ($\Delta rnT\text{-attB}::rnT$) lub $rnZ1$ ($\Delta rnZ1Z2\text{-attB}::rnZ1$). Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą testu t-studenta, wykazano istotność statystyczną na poziomie $*p < 0,05$.

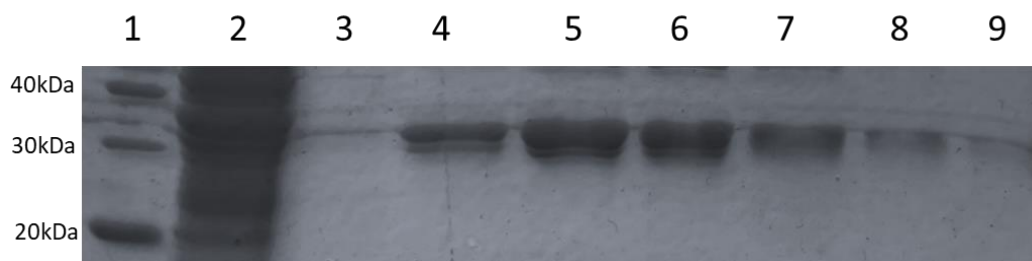
Komplementacja mutantów ΔrnT oraz $\Delta rnZ1$ funkcjonalnymi odpowiednikami genów spowodowała całkowite ($\Delta rnT\text{-attB}::rnT$) lub częściowe ($\Delta rnZ1Z2\text{-attB}::rnZ1$) przywrócenie fenotypu szczepu dzikiego (Rycina 5.4.9).

5.5. Ocena aktywności badanych enzymów *M. smegmatis* z nadrodziny DnaQ

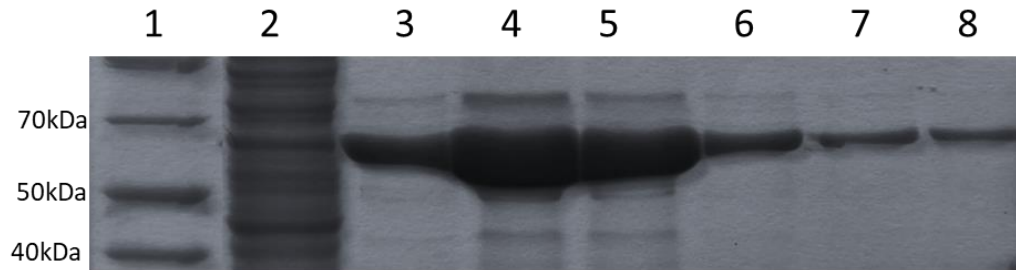
Do nadprodukcji rekombinowanych białek RNaz z nadrodziny DnaQ, stosowano wektory pozwalające na ich indukowaną ekspresję w komórkach *E. coli*. W tym celu dla białek RNazy PH, RNazy D oraz RNazy Z2 wykorzystano wektor ekspresyjny pHIS. Szczegółowe etapy konstrukcji wektorów ekspresyjnych przedstawiono w rozdziale Metody 4.18. Ze względu na konieczność przystosowania optymalnych kodonów dla aminokwasów (codon usage) dla *E. coli* do nadprodukcji białek RNaza Z1 oraz RNaza T wykorzystywano rekombinowany plazmid pET28 przygotowany przez firmę GeneScript.

Nadprodukcję badanych białek w systemach ekspresji *E. coli* oraz ich oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa przeprowadzono w sposób opisany

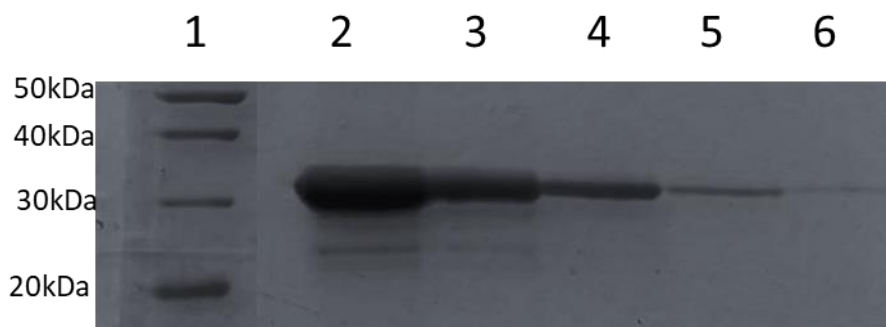
w rozdziale (Metody 4.19). W hodowlach prowadzonych w małej skali dopracowywano parametry indukcji białka a następnie przeprowadzono właściwą nadprodukcję w objętości 1 L podłoża LB. Rekombinowane białka zawierające fuzyjną, N-terminalną sekwencję 6-His oczyszczano na złożu HisPur Ni-NTA. Poszczególne frakcje wyptukiwano ze złoża podczas oczyszczania i analizowano w elektroforezie SDS-PAGE. RNazę PH oczyszczono z wykorzystaniem plazmidu pEL40 w komórkach *E. coli* BL21, indukcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 18°C, w obecności 0,4 mM IPTG. Oczyszczanie przeprowadzono w buforze HEPES przy pH 7 (Rycina 5.5.1). RNazę D oczyszczono z wykorzystaniem plazmidu pEL42 w komórkach *E. coli* BL21 pLysS, indukcję prowadzono przez 3,5 godziny w temperaturze 18°C, w obecności 0,4 mM IPTG. Oczyszczanie przeprowadzono w buforze Tris przy pH 7 (Rycina 5.5.2). RNazę Z2 oczyszczono z wykorzystaniem plazmidu pEL44 w komórkach *E. coli* Rosetta, indukcję prowadzono przez 2 godziny w 22°C, w obecności 0,2 mM IPTG. Oczyszczanie prowadzono w buforze HEPES przy pH 8 (Rycina 5.5.3). RNazę T oraz Z1 oczyszczono z wykorzystaniem wektora pET28 (GenScript) w komórkach *E. coli* pLys a białka indukowano przez 24 godziny, w temperaturze 20 °C, do oczyszczania użyto w bufor Tris przy pH8 (Rycina 5.5.4 i Rycina 5.5.5).



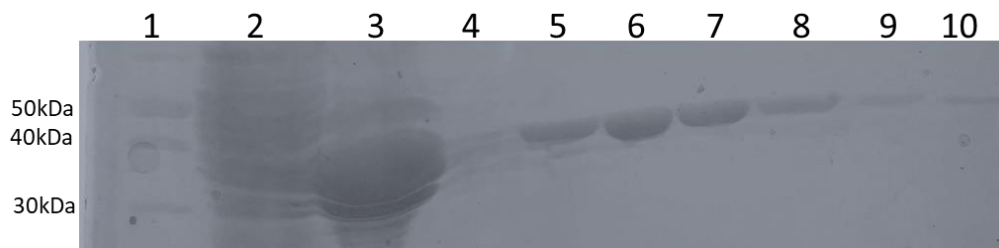
Rycina 5.5.1 Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka RnPH. Teoretyczna masa cząsteczkowa białka wynosi 27 kDa, masa metki histydynowej 3 kDa; 1 - wzorzec mas cząsteczkowych, 2 – osad bakteryjny po lizie, 3 -9 – frakcje po elucji ze złoża buforem z imidazolem.



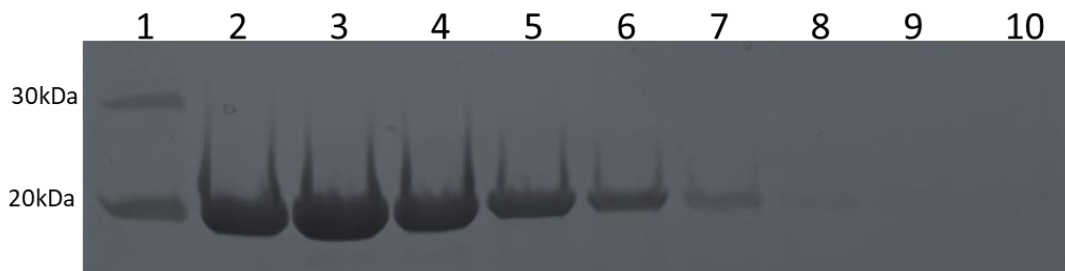
Rycina 5.5.2. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka RnD. Teoretyczna masa cząsteczkowa białka wynosi 45 kDa, masa metki histydynowej 3 kDa; 1 – wzorzec mas cząsteczkowych, 2 – osad bakteryjny po lizie, 3-8 – frakcje po elucji ze złoża buforem z imidazolem.



Rycina 5.5.3 Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka RnZ2. Teoretyczna masa cząsteczkowa białka wynosi 30 kDa, masa metki histydynowej 3 kDa; 1 – wzorzec mas cząsteczkowych, 2-6 – frakcje po elucji ze złoża buforem z imidazolem.

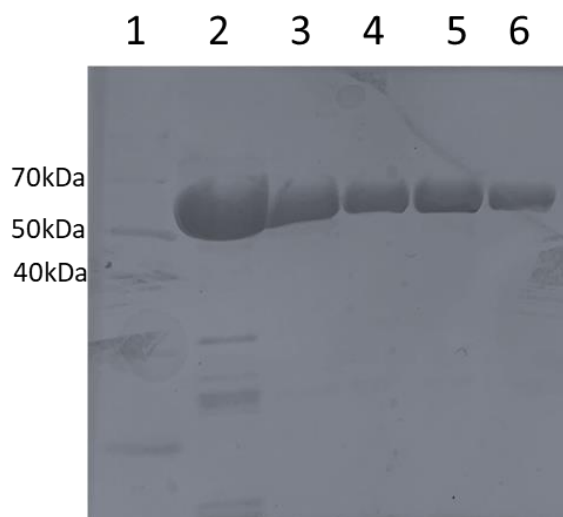


Rycina 5.5.4. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka RNazy Z1. Teoretyczna masa cząsteczkowa białka wynosi 34 kDa, 3 kDa masa metki histydynowej; 1 – wzorzec mas cząsteczkowych, 2 – osad bakteryjny po lizie, 3-10 – frakcje po elucji ze złoża buforem z imidazolem.



Rycina 5.5.5. Analiza SDS-PAGE frakcji zebranych podczas oczyszczania białka RNazy T. Teoretyczna masa cząsteczkowa białka wynosi 20 kDa, masa metki histydynowej 3 kDa; 1 – wzorzec mas cząsteczkowych, 2-10 – frakcje po elucji ze złoża buforem z imidazolem.

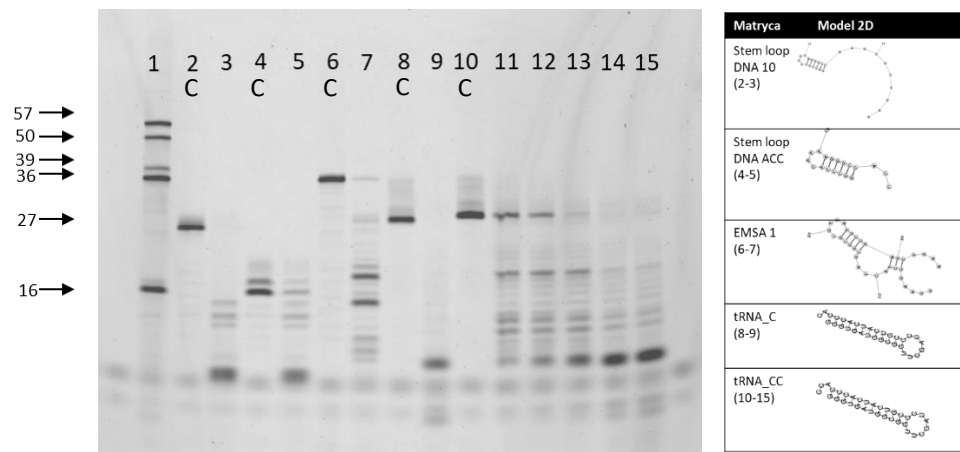
Następnie uzyskane preparaty białkowe poddano oczyszczaniu przez system AKTA Start. Przykład preparatu białka oczyszczonego z wykorzystaniem systemu AKTA Start zaprezentowano na Rycinie 5.5.6.



Rycina 5.5.6. Analiza SDS-PAGE Rnazy D przed i po oczyszczaniu z wykorzystaniem systemu AKTA Start. 1- wzorzec mas cząsteczkowych, 2- RNaza D po oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa, 3 – 6 frakcje białka zebrane po oczyszczaniu na kolumnie do filtracji żelowej.

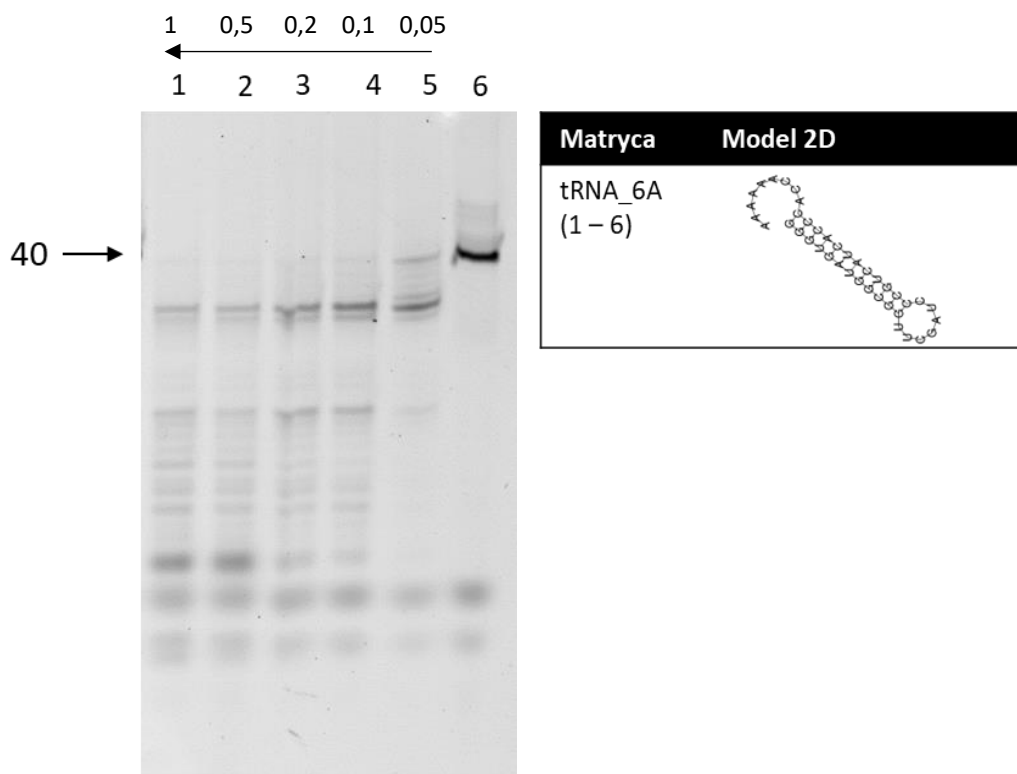
W ten sposób przygotowane białka wykorzystano do przeprowadzenia testów aktywności enzymatycznej z zastosowaniem szeregu matryc oligonukleotydowych RNA i DNA. W żelu poliakrylamidowym z 7 M moczniakiem rozdzielano mieszaninę reakcyjną zawierającą badane białka inkubowane z matrycami oligonukleotydowymi RNA lub DNA (Tabela 3.4.2). Optymalne warunki reakcji takie jak: stężenie białka, skład buforu, temperaturę i czas inkubacji wyznaczano indywidualnie dla każdego enzymu. Dla rekombinowanego białka RNazy D przeprowadzono reakcję w obecności substratów RNA, w tym stanowiących fragment 3' cząsteczki tRNA (tRNA_C, tRNA_CC), RNA inny niż

tRNA (EMSA1) oraz DNA (stem_loop DNA). We wszystkich przypadkach obserwowano degradację użytego substratu w obecności 5 μM RNazy D. W przypadku substratu tRNACC zbadano także niższe stężenia enzymu obserwując degradację już w obecności 0,5 μM RNazy D (Rycina 5.5.6).



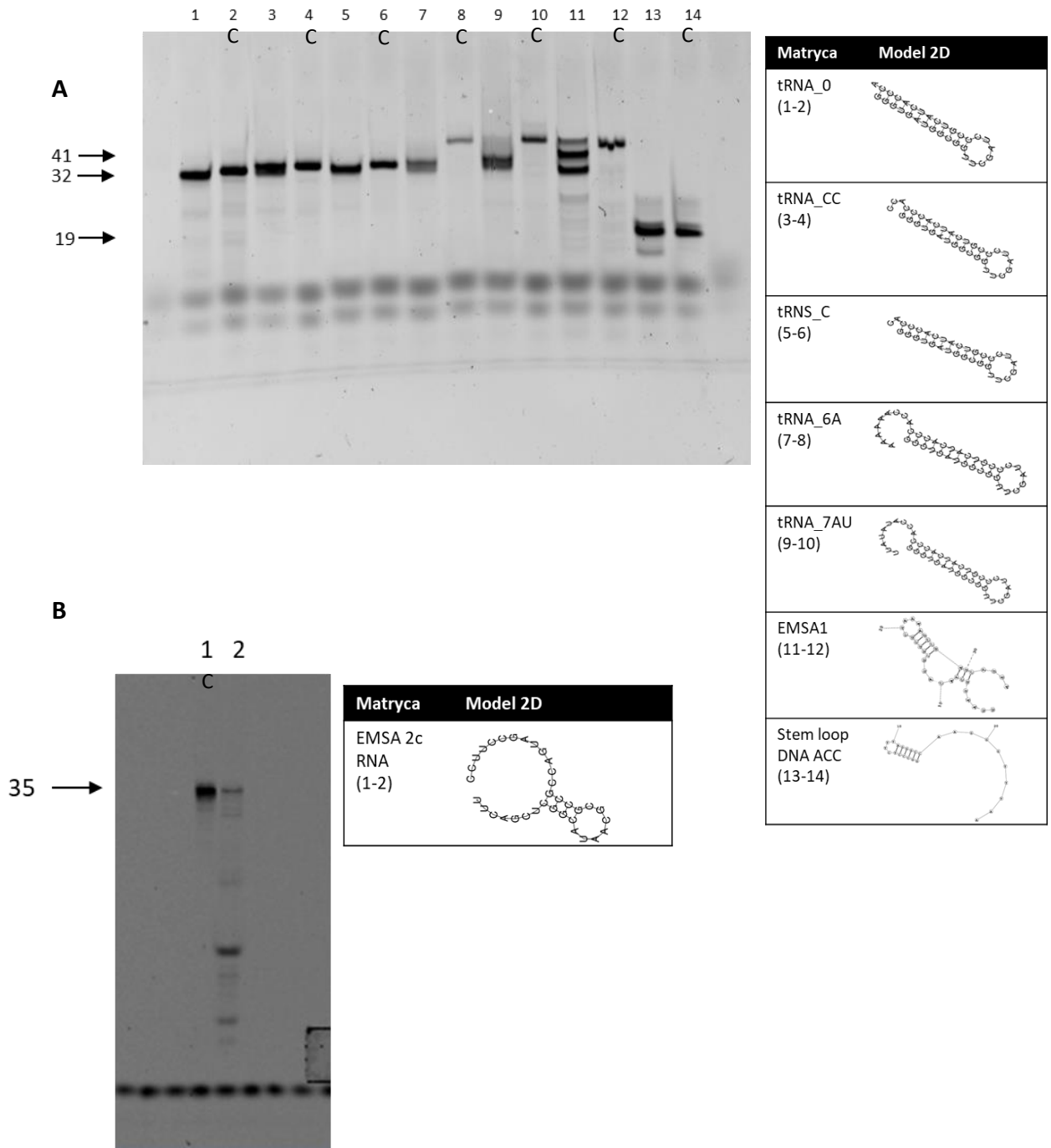
Rycina 5.5.6. Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA lub DNA z RNazą D. 1 marker wielkości; 2-3 stem loop DNA 10; 4-5 stem loop DNA ACC; 6-7 EMSA1; 8-9 tRNA_C; 10-15 tRNA_CC, W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 3, 5, 7, 9 użyto 5 μM RNazy D, a w reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 11 (0,5 μM), 12 (0,1 μM), 13 (0,2 μM) RNazy D, 14 (0,5 μM), 15 (1 μM) RNazy D. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

W kolejnym badaniu przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem matrycy tRNA posiadającej na 3' końcu 6 nukleotydów adeninowych (3'tRNA_6A) i białka RNazy D w zakresie stężeń od 0,05 do 1 μM . Wraz ze wzrastającym stężeniem białka obserwowano stopniową degradację jednoniciowej sekwencji 6A a następnie całej cząsteczki RNA (Rycina 5.5.7).



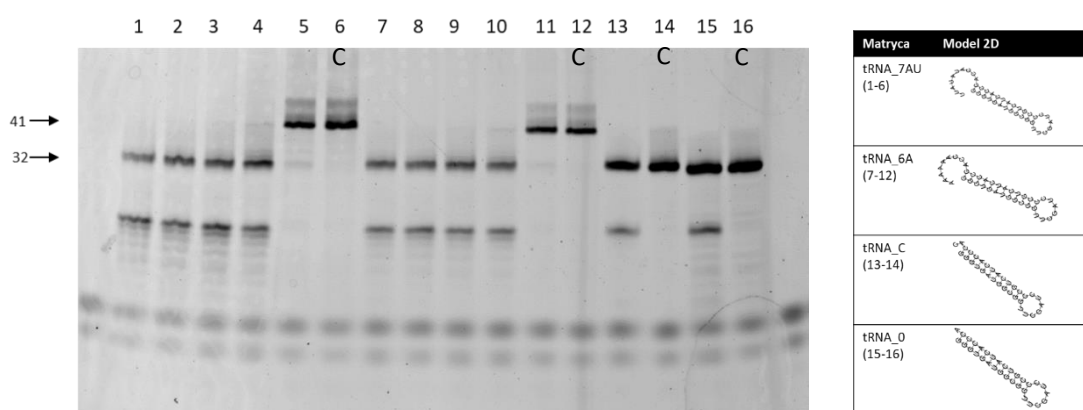
Rycina 5.5.7. Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA z RNazą D. W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 1 użyto 1 μM RNazy D, 2 (0,5 μM), 3 (0,2 μM), 4 (0,1 μM), 5 (0,05 μM) RNazy D.

W następnej kolejności zbadano aktywność RNazy T w stosunku do substratów tRNA charakteryzujących się obecnością na 3' końcu dodatkowych nukleotydów odpowiednio: tRNA (tRNA_0) tRNA wydłużony o 1 (C), 2 nukleotydy (CC), 6 nukleotydów 6A lub sekwencje 7 nukleotydów (AAUAUAU). Jako kontrolę zastosowano cząsteczkę RNA (EMSA1). Z przeprowadzonych reakcji wykazano aktywność RNazy T w stosunku do jednoniciowych fragmentów RNA znajdujących się na 3' końcu badanych cząsteczek tRNA-like. Nie zaobserwowano degradacji dwuniciowych form RNA oraz cięcia w obrębie krótkich jednoniciowych fragmentów wewnątrz struktury (Rycina 5.5.8).



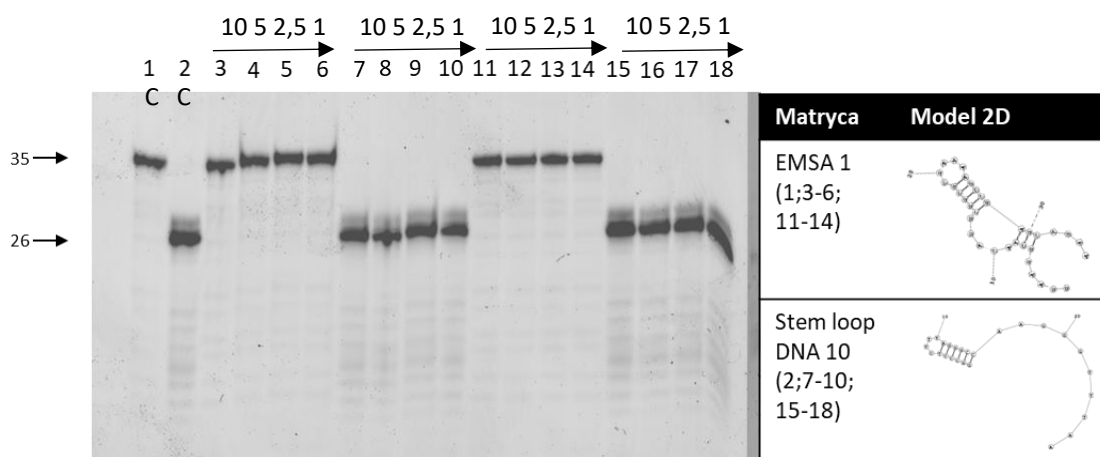
Rycina 5.5.8. (A) Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA lub DNA z RNazą T. 1-2 tRNA_0, 3-4 tRNA_CC, 5-6 tRNA_C, 7-8 tRNA_6A, 9-10 tRNA_7AU, 11-12 EMSA 1, 13-14 stem loop DNA. W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 użyto 10 μ M RNazy T. (B) Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA (EMSA 2c RNA) z RNazą T. W reakcji rozdzielanej w ścieżce 2 użyto 1 μ M RNazy T. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

Aktywność RNazy PH badano w stosunku do szeregu matryc tRNA-like, w tym matrycy pozbawionej jednoniciowego fragmentu na końcu 3' (tRNA_0) oraz matrycy posiadającej na końcu 3' dodatkowy nukleotyd cytozynowy (C), 6-nukleotydową sekwencję adeninową (6A) lub 7-nukleotydową sekwencję AU. Zaobserwowano, że w stężeniu powyżej 0,05 μM RNaza PH usuwa jednoniciową sekwencję 6A lub 7AU RNA na końcu 3' cząsteczki tRNA-like a dodatkowo rozcina cząsteczkę RNA na dwa fragmenty, prawdopodobnie w miejscu jednoniciowej pętli. Cząsteczki tRNA_0 oraz tRNA_C nie uległy skróceniu w reakcji z badaną RNazą. Zaobserwowano natomiast przecięcie badanych matryc na dwa fragmenty (Rycina 5.5.9).



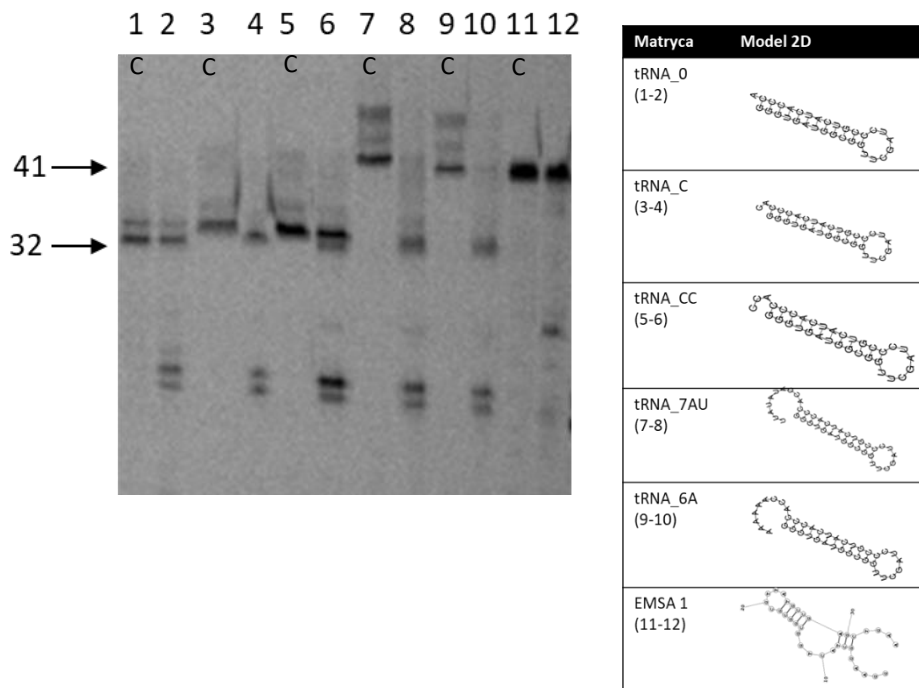
Rycina 5.5.9. Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy z Rnazą PH. 1-6 tRNA_7AU, 7-12 tRNA_6A, 13-14 tRNA_C, 15-16 tRNA_0. W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 1 i 7 użyto 1 μM , 2 i 8 (0,5 μM), 3 i 9 (0,2 μM), 4 i 10 (0,1 μM) 5 i 11 (0,05 μM) RNazy PH. W ścieżkach 13 i 15 zastosowano 1 μM RNazy PH. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

Aktywność enzymu RNazy PH badano także w stosunku do innych matryc RNA oraz DNA. W obecności RNazy PH nawet w stężeniu 10 μM , w obecności dwuwartościowych jonów Mg lub Mn nie zaobserwowano degradacji oligonukleotydów RNA i DNA zdolnych do tworzenia drugorzędowych struktur (Rycina 5.5.10).

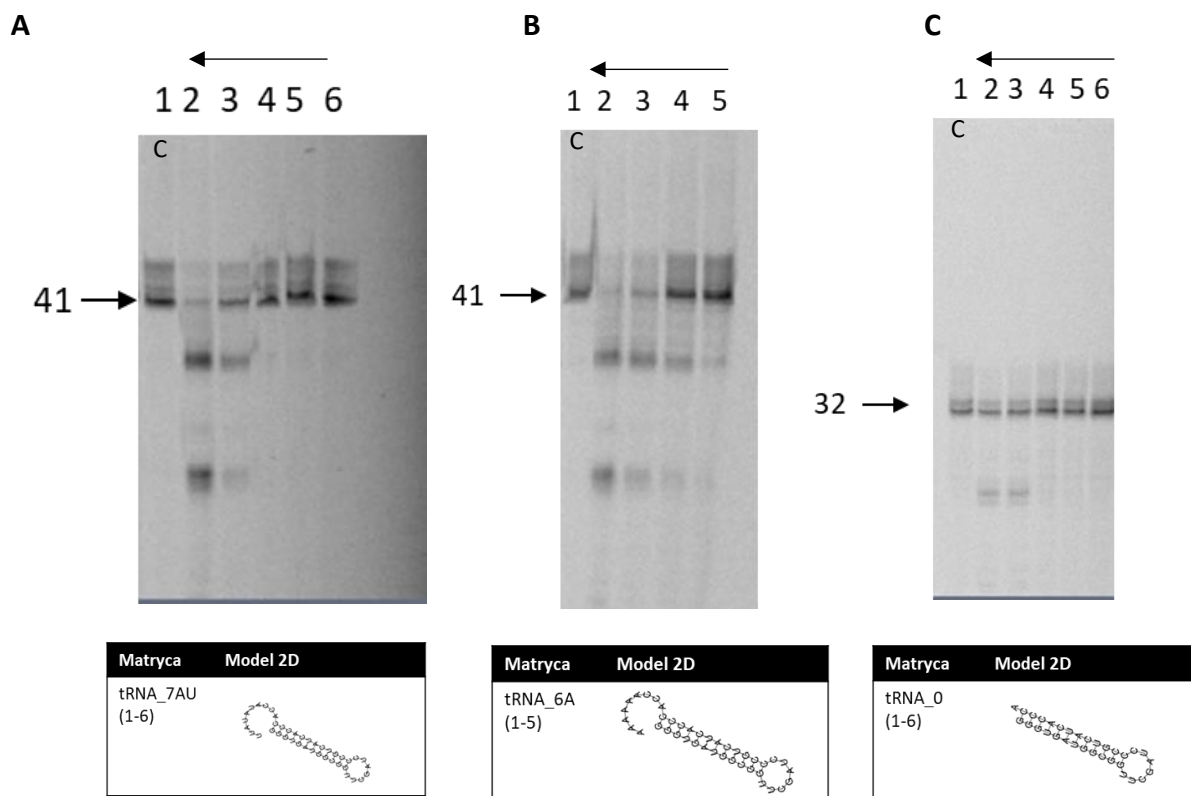


Rycina 5.5.10. Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy DNA z RNazą PH. Ścieżki 1; 3-6 oraz 11 – 14 EMSA 1, w ścieżkach 2; 7-10 oraz 15-18 stem loop DNA 10. W ścieżkach 3 –10 użyto buforu z jonami manganu, w ścieżkach 11 – 18 z jonami magnezu. W ww. ścieżkach wykorzystano 10; 5; 2,5 i 1 μ M RNazy PH. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

Aktywność RNazy Z1 badano w stosunku do tych samych matryc tRNA-like jakie wykorzystano dla RNazy PH: w tym matrycy tRNA₀, 3' tRNA C, 3'tRNA 6A i 3'tRNA 7AU oraz matrycę DNA (EMSA 1). Zaobserwowano, że w stężeniu 1 μ M RNaza Z1, podobnie jak RNaza PH, usuwa jednoniciową sekwencję 6A i 7AU na końcu 3' cząsteczki tRNA-like i prawdopodobnie rozcina tę cząsteczkę na dwa fragmenty w miejscu jednoniciowej sekwencji. W przypadku matrycy DNA zaobserwowano także cięcie w obrębie jednoniciowej sekwencji (Rycina 5.5.11 i 5.5.12).

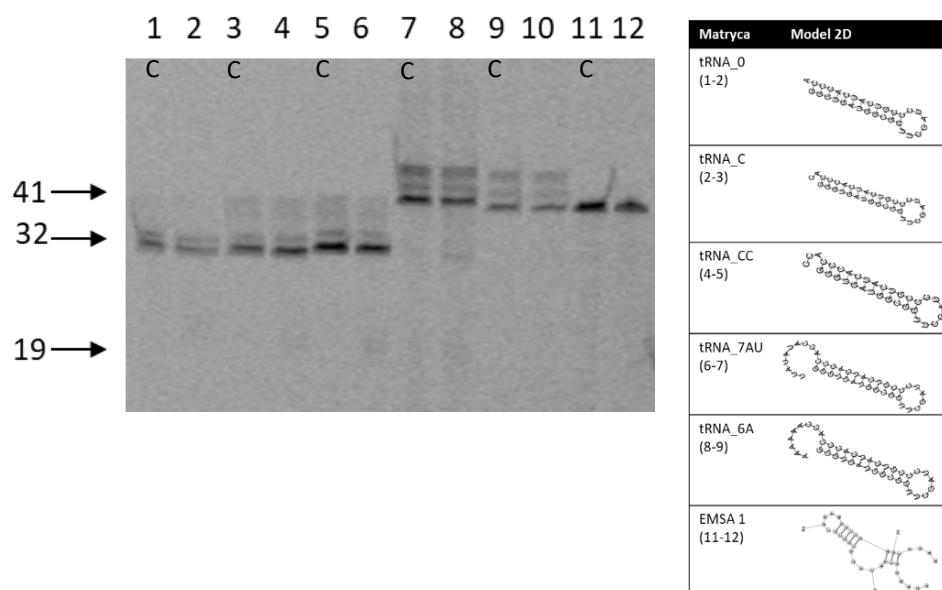


Rycina 5.5.11. Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA i DNA z RNazą Z1. Ścieżka 1-2 tRNA_0, 3-4 tRNA_C, 5-6 tRNA_CC, 7-8 tRNA_AU, 9-10 tRNA_6A, 11-12 EMSA 1. W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 2, 4, 6, 8, 10, 12 użyto 1 μ M RNazy Z1. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.



Rycina 5.5.12 (A) Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA (ścieżki 1-6 tRNA_7AU) z RNazą Z1. W reakcji rozdzielanej w ścieżce 2 użyto 1 μM , 3 (0,5 μM), 4 (0,2 μM), 5 (0,1 μM), 6 (0,05 μM) RNazy Z1. (B) Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA (ścieżki 1-5 tRNA_6A) z RNazą Z1. W reakcji rozdzielanej w ścieżce 2 użyto 1 μM RNazy Z1, 3 (0,5 μM), 4 (0,2 μM), 5 (0,1 μM) RNazy Z1. (C) Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matrycy RNA (ścieżki 1-5 tRNA_0) z RNazą Z1. W reakcji rozdzielanej w ścieżce 2 użyto 1 μM RNazy Z1, 3 (0,5 μM), 4 (0,2 μM), 5 (0,1 μM), 6 (0,05 μM) RNazy Z1. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

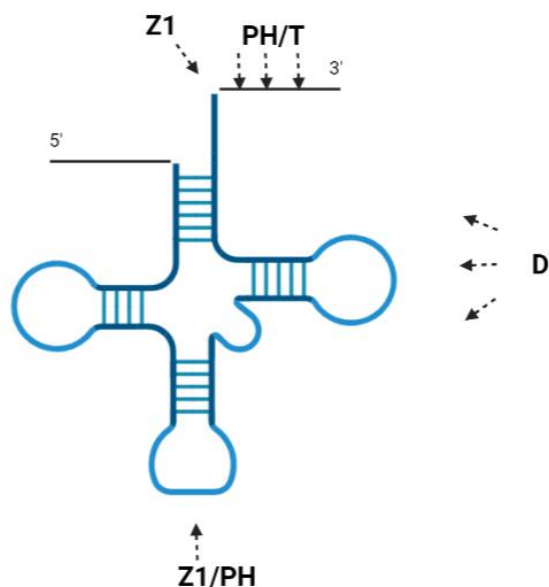
Aktywność RNazy Z1 w stosunku do matryc tRNA-like sprawdzano także w mniejszych stężeniach. Cięcie cząsteczki zawierającej łańcuch 7AU oraz cząsteczki tRNA_0 zaobserwowano przy stężeniu 0,5 μM , cząsteczki zawierającej łańcuch 6A (0,1 μM).



Rycina 5.5.13 Rozdział elektroforetyczny fragmentów oligonukleotydowych uzyskanych po inkubacji matryc RNA i DNA z RNazą Z2. Ścieżki 1-2 (tRNA_0), 3-4 (tRNA_C), 5-6 (tRNA_CC), 7-8 (tRNA_7AU), 9-10 (tRNA_6A), 11-12 (EMSA 1). W reakcjach rozdzielanych w ścieżkach 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 zastosowano 1 μ M RNazy Z2. Reakcje kontrolne prowadzone bez obecności badanego enzymu oznaczono literą C.

Aktywność RNazy Z2 testowano z użyciem szeregu matryc RNA i nie zaobserwowano aktywności nukleolitycznej tego białka (Rycina 5.5.13).

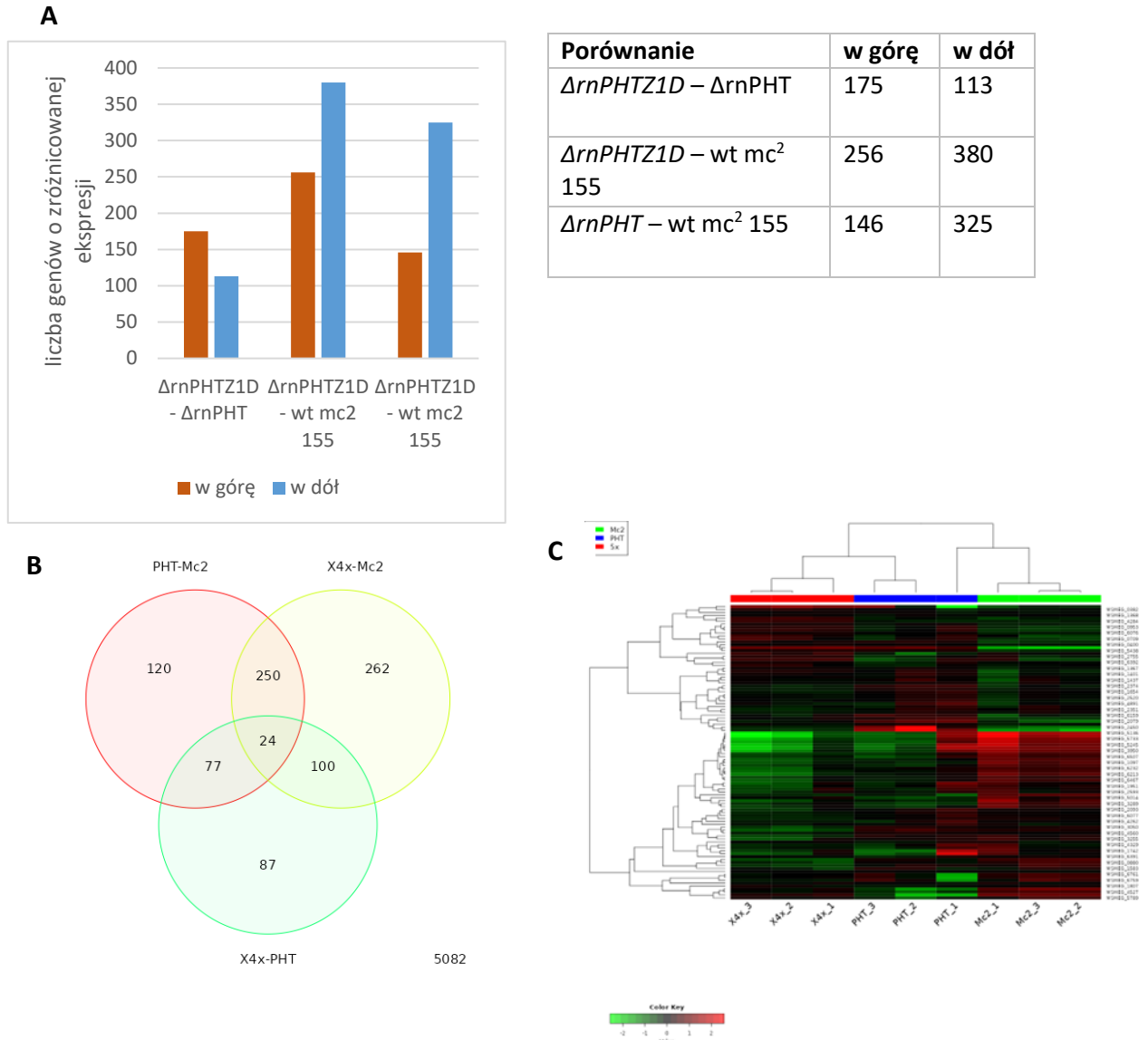
Przeprowadzone badania aktywności enzymatycznej rekombinowanych białek wskazują, że cząsteczki tRNA na końcu 3' mogą być procesowane przez RNazę T, RNazę PH oraz RNazę D. Jednakże tylko RNaza T wykazuje aktywność wyłącznie w stosunku do jednoniciowego fragmentu RNA znajdującego się na końcu 3' substratów tRNA-like. Enzym ten nie wykazywał aktywności w stosunku do innych badanych cząsteczek RNA i DNA co może wskazywać na jego kluczową rolę przy dojrzewaniu 3'-końca tRNA u mykobakterii. RNaza PH częściowo wykazuje podobną aktywność jak RNaza T, degradując jednoniciowe fragmenty RNA na końcu 3' cząsteczek tRNA-like, jednakże enzym ten dodatkowo rozcina badane substraty w miejscu jednoniciowej pętli. RNaza PH nie wykazywała aktywności w stosunku do innych substratów RNA oraz DNA, użytych w naszych doświadczeniach, niż tRNA-like. Natomiast zaobserwowano aktywność katalityczną w stosunku do wszystkich użytych substratów RNA i DNA RNazy D, nawet przy bardzo niskim stężeniu białka (0,05 μ M). RNaza Z1 posiada aktywność endo i egz nukleazy RNA. Rycina 5.5.14 przedstawia działanie nukleaz z nadrodziny DnaQ w oparciu o wyżej przedstawione wyniki.



Rycina 5.5.14. Model cząsteczki tRNA uwzględniający działanie nukleaz z nadrodziny DnaQ.

5.6. Analiza transkryptomyczna mutantów nukleaz z nadrodziny DnaQ

W celu sprawdzenia globalnej odpowiedzi transkrypcyjnej prątków na brak badanych egzonukleaz wykonano sekwencjonowanie bibliotek RNA z wykorzystaniem zestawu KAPA Stranded RNA-Seq Library Preparation Kit. Analiza transkryptomyczna mutantów *M. smegmatis* pozbawionych dwóch funkcjonalnych nukleaz z rodziny DnaQ (RNazy PH i RNazy T) oraz mutantu pozbawionego jednocześnie czterech genów kodujących RNazę PH, RNazę T, RNazę Z1 oraz RNazę D wykazała szereg zmian w stosunku do szczepu kontrolnego, który stanowił *M. smegmatis* mc² 155. Największą liczbę zmian zaobserwowano porównując mutantu $\Delta rnPHTZ1D$ w stosunku do szczepu dzikiego, w którym 256 genów uległo nadekspresji a w 380 genach ekspresja obniżyła się u mutantu. Spośród genów o zmienionym poziomie ekspresji u badanych mutantów w porównaniu do szczepu kontrolnego aż 250 stanowi wspólny zbiór (Rycina 5.6.1).

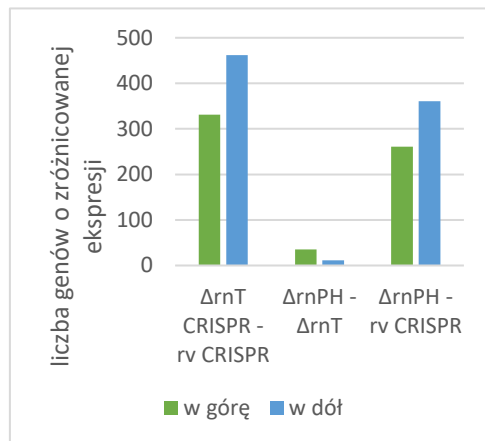


Rycina 5.6.1. Globalna analiza transkryptomów mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów wybrany RNaz. (A) Liczba genów o zmienionej ekspresji u badanych mutantów (DEG). (B) Diagram Venna obrazujący geny o zmienionej ekspresji u badanych mutantów. (C) Mapa ciepła obrazująca zróżnicowaną ekspresję między transkryptomami badanych mutantów w indywidualnych powtórzeniach. Dane są wyśrodkowane przez odjęcie średniego poziomu ekspresji dla każdego genu. Macierz odległości wynosi $1 - r$, gdzie r jest współczynnikiem korelacji Pearsona.

Następnie zbadano jaki wpływ na transkryptom *M. tuberculosis* ma obniżenie poziomu ekspresji RNazy PH lub RNazy T. W tym celu z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 przygotowano mutanty warunkowe *M. tuberculosis* z obniżonym poziomem RNazy PH oraz RNazy T z użyciem odpowiednich sekwencji oligonukleotydowych i wektora pLJR965 (Tabela. 3.4.).

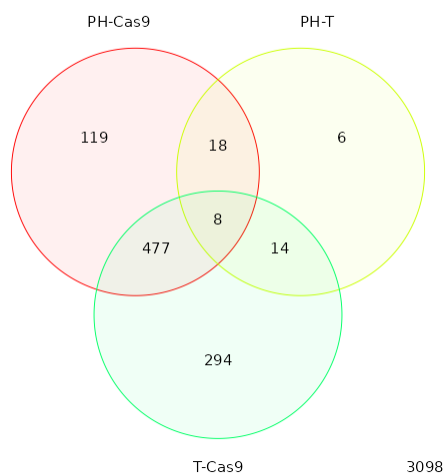
Deplecja RNazy PH lub T nie wpływała znacząco na kinetykę wzrostu badanych mutantów, stąd obserwowane zmiany w transkryptomie powinny być odzwierciedleniem bezpośredniej aktywności badanych enzymów w komórce. Sekwencjonowaniu poddano całkowity RNA izolowany z mutantów *rnT*_{MtbCas9} oraz *rnPH*_{MtbCas9} a uzyskane dane porównano do szczepu kontrolnego noszącego wektor pLJR 965 (wektor CRISPR-Cas9 dla *M. tuberculosis*). Przeprowadzona analiza wykazała znaczące zmiany ilościowe transkryptów dla wielu genów. Szczep *rnPH*_{MtbCas9} charakteryzował się obniżoną ekspresją 361 genów oraz nadprodukcją 261 genów. Szczep *rnT*_{MtbCas9} charakteryzował się obniżoną ekspresją 462 genów oraz nadprodukcją 331 genów. U obu mutantów zaobserwowano nadekspresję składnika białkowego rybonukleazy P (*rv3923c*). Dodatkowo zaobserwowano wysoki spadek ilości transkryptów kodujących mały regulatorowy RNA (*MTB000077*), którego poziom zależny jest od DosR (Moore i in., 2017), oraz białko rybosomalne 50S (*rv2058c*). U badanych mutantów (w porównaniu do szczepu kontrolnego) obniżeniu ulega także poziom transkryptów kodujących przypuszczalne antytoksyny MazE9 oraz MazE2 (Tabela 5.6.3). Podczas analizy poszczególnych odczytów korzystając z programu Integrative Genomic Viewer nie zaobserwowano akumulacji niedojrzałych transkryptów tRNA o wielkości pozwalającej na ich detekcję w ramach bibliotek przygotowanych dla całkowitego RNA.

A

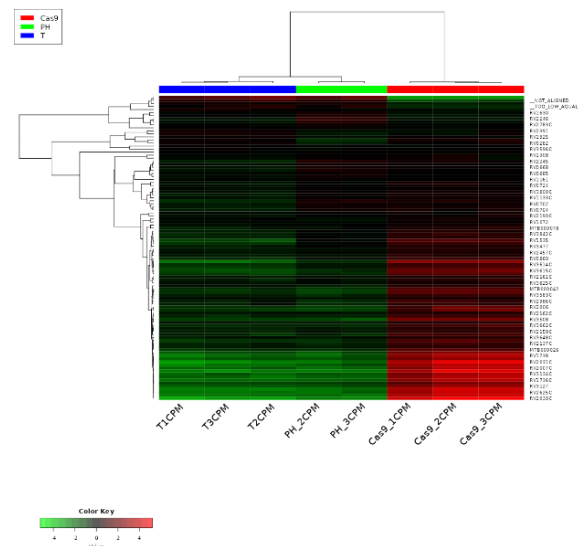


Porównanie	w górę	w dół
ΔrnT CRISPR - rv CRISPR	331	462
ΔrnPH - ΔrnT	35	11
ΔrnPH - rv CRISPR	261	361

B



C

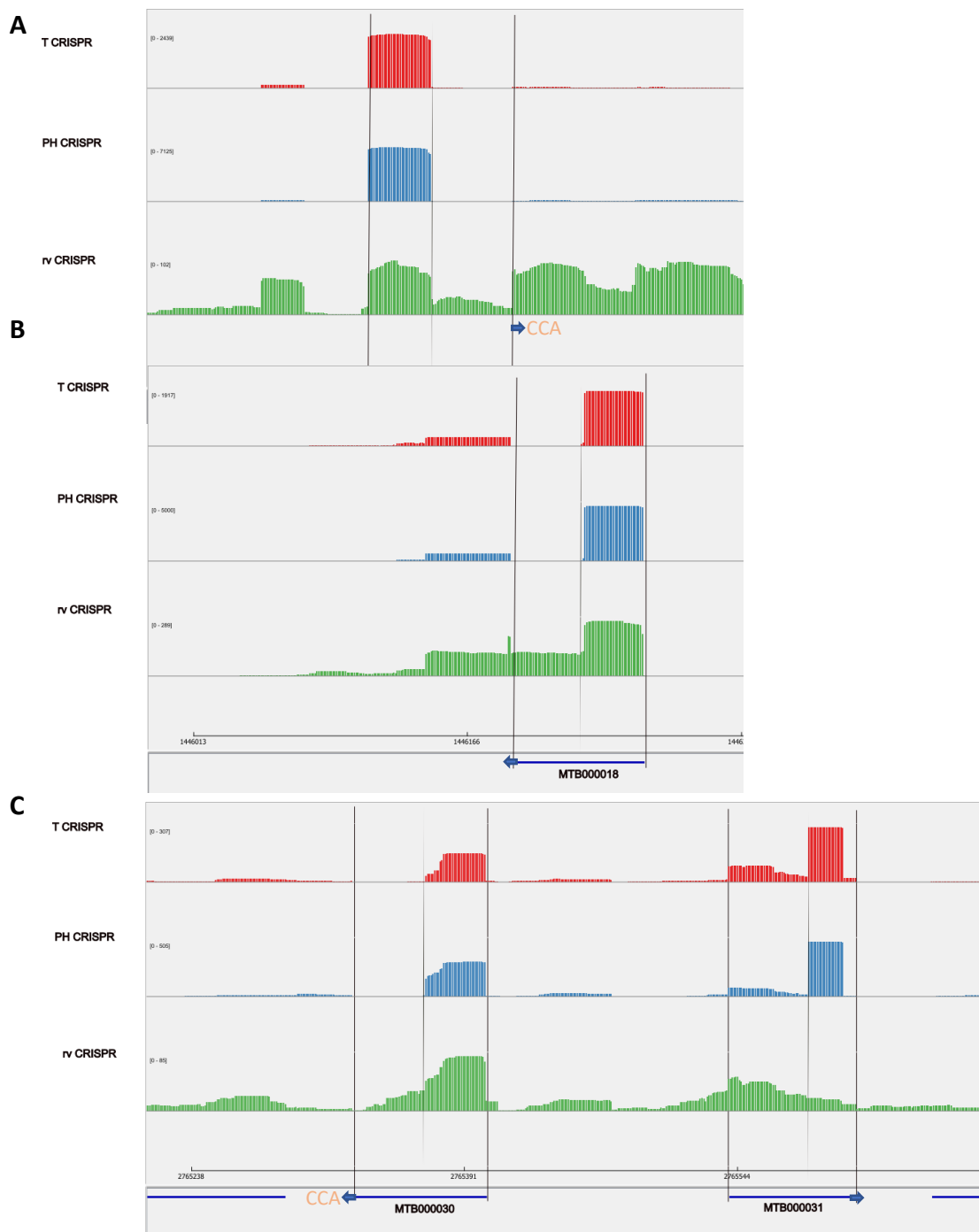


Rycina 5.6.2. Globalna analiza transkryptomów mutantów *M. tuberculosis* z obniżonym poziomie RNazy T/ RNazy PH. (A) Liczba genów o zmienionej ekspresji u badanych mutantów (DEG). (B) Diagram Venna obrazujący geny o zmienionej ekspresji u badanych mutantów. (C) Mapa ciepła obrazująca zróżnicowaną ekspresję między transkryptomami badanych mutantów w indywidualnych powtórzeniach. Dane są wyśrodkowane przez odjęcie średniego poziomu ekspresji dla każdego genu. Macierz odległości wynosi $1-r$, gdzie r jest współczynnikiem korelacji Pearsona.

Tabela 5.6.3. Wybrane geny o zmienionej ekspresji u mutantów *rnPH*_{MtbCas9} i *rnT*_{MtbCas9} - wybrano największe różnice.

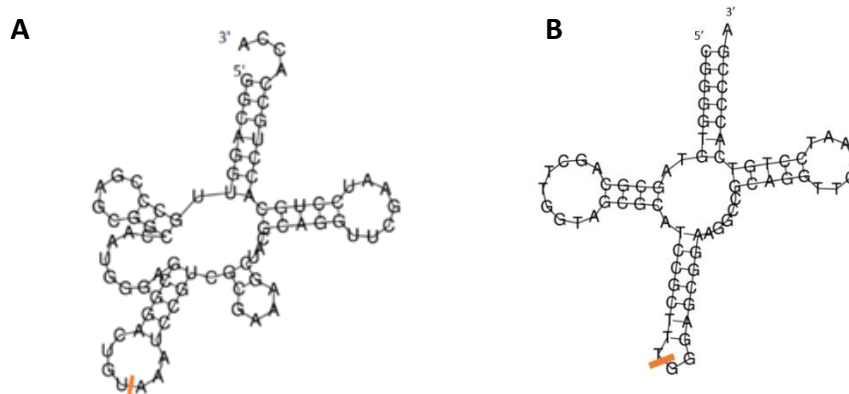
<i>gen</i>	<i>produkt</i>	<i>różnica ΔrnPH</i>	<i>różnica ΔrnT</i>
<i>Rv3923c</i>	białkowy komponent rybonukleazy P RnpA	2,11	1,50
<i>MTB000026</i>	rybonukleaza P RNA	-2,57	-2,73
<i>Rv2801A</i>	prawdopodobna antytoksyna MazE9	-2,83	-1,59
<i>Rv0660c</i>	prawdopodobna antytoksyna MazE2	-3,08	-2,52
<i>MTB000077</i>	domniemany mały regulatorowy RNA	-6,72	-6,07
<i>Rv2058c</i>	50S białko rybosomalne L28 RpmB2	-7,08	-4,76

Całkowity RNA wyizolowany z mutantów z obniżonym poziomem RNazy PH i RNazy T, użyto także do przygotowania bibliotek małego RNA pozwalających na sekwencjonowanie cząsteczek RNA o zakresie wielkości od 20 do 300 nukleotydów w tym cząsteczek tRNA. Analiza transkryptomów badanych mutantów w porównaniu do szczepu kontrolnego pozwoliła na identyfikację 34 genów o zwiększonej i 25 o zmniejszonej ekspresji wśród badanych małych RNA. Analizując ekspresję tRNA zaobserwowano silną nadprodukcję 21 rodzajów tRNA w mutancie *rnPH*_{MtbCas9} oraz 16 w mutancie *rnT*_{MtbCas9} (Tabela 5.6.6 – 5.6.7). Bardziej szczegółowa analiza transkryptów z wykorzystaniem programu Integrative Genomics Viewer wykazała, że wiele z rodzajów tRNA u obu mutantów ulega znaczącej akumulacji [tRNA-Tyr (GTA), tRNA-Arg (CCG), tRNA-Pro (TGG), tRNA-Gly (TCC)], lecz w postaci niekompletnych transkryptów, obejmujących wyłącznie część 5' genu. W szczepie kontrolnym fragment 5' transkryptów był również silniej reprezentowany, widoczne były jednak także odczyty dla części 3' analizowanych tRNA (Rycina 5.6.4).



Ryc 5.6.4. Akumulacja produktów dojrzewania tRNA u mutantów *rnPH MtbCas9* i *rnT MtbCas9* (A) tRNA-Tyr (GTA) (B) tRNA-Arg (CCG) (C) tRNA-Pro (TGG), tRNA-Gly (TCC).

Analiza sekwencji odczytów uzyskanych podczas sekwencjonowania dla poszczególnych tRNA u badanych mutantów wskazuje, że transkrypty te ulegają cięciu w obrębie sekwencji antykodonu, czyli w połowie cząsteczki tRNA (Rycina 5.6.5). O nieprawidłowym procesie dojrzewania cząsteczek tRNA w przypadku mutantu *rnPH_{MtbCas9}* świadczyć może także brak metylacji transkryptów kodujących tRNA-Gln (TTG) oraz tRNA-Glu (CTC) (Rycina 5.6.8).



Rycina 5.6.5. Przekucie cząsteczek (A) tRNA-Tyr (GTA) i (B) tRNA -Pro (TGG) w obrębie sekwencji antykodonu (pomarańczowa kreska).

Tabela 5.6.6. Analiza transkryptomocznica mutantu *rnPH_{MtbCas9}* - wybrane największe różnice.

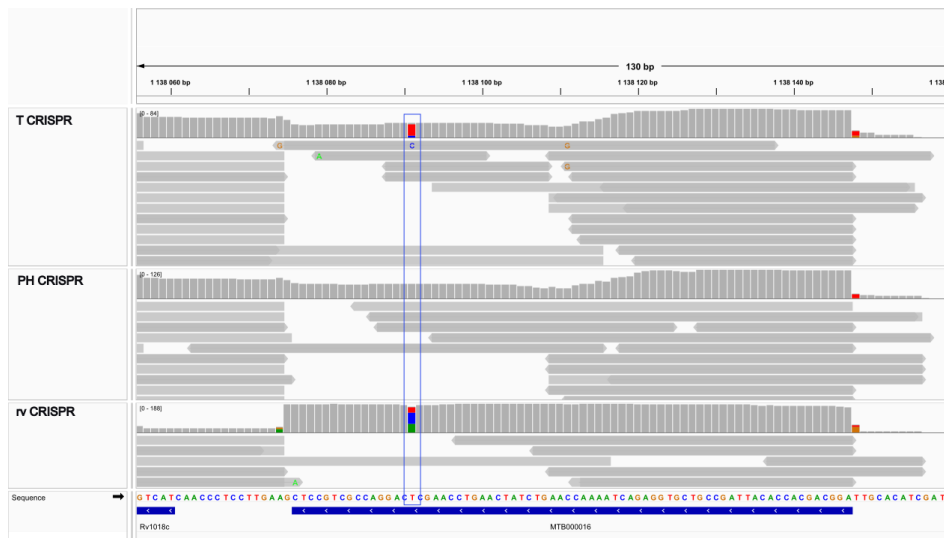
<i>gen</i>	<i>produkt</i>	<i>różnica ΔrnPH</i>
MTB000005	tyrT tRNA-Tyr (GTA)	5,309488839
MTB000029	asnT tRNA-Asn (GTT)	4,383472583
MTB000050	serU tRNA-Ser (TGA)	4,119547381
MTB000018	argV tRNA-Arg (CCG)	3,470749981
MTB000017	leuX tRNA-Leu (TAA)	2,839559892
MTB000031	glyV tRNA-Gly (TCC)	2,374869787
MTB000047	serX tRNA-Ser (CGA)	2,245937985
MTB000048	argU tRNA-Arg (ACG)	2,17925783
MTB000049	serT tRNA-Ser (GCT)	2,165912859
MTB000036	glyT tRNA-Gly (GCC)	2,118986135
MTB000013	pheU tRNA-Phe (GAA)	2,109122723
MTB000038	valU tRNA-Val (GAC)	2,082968202
MTB000004	glyU tRNA-Gly (CCC)	2,019910224
MTB000034	lysU tRNA-Lys (CTT)	1,932272096
MTB000037	cysU tRNA-Cys (GCA)	1,74668713
MTB000035	valT tRNA-Val (CAC)	1,609465172
MTB000045	proY tRNA-Pro (CGG)	1,594337177
MTB000027	valV tRNA-Val (TAC)	1,580334732
MTB000025	leuU tRNA-Leu (GAG)	1,520566585

MTB000022	leuW tRNA-Leu (TAG)	1,455062131
MTB000024	proT tRNA-Pro (GGG)	1,414880768

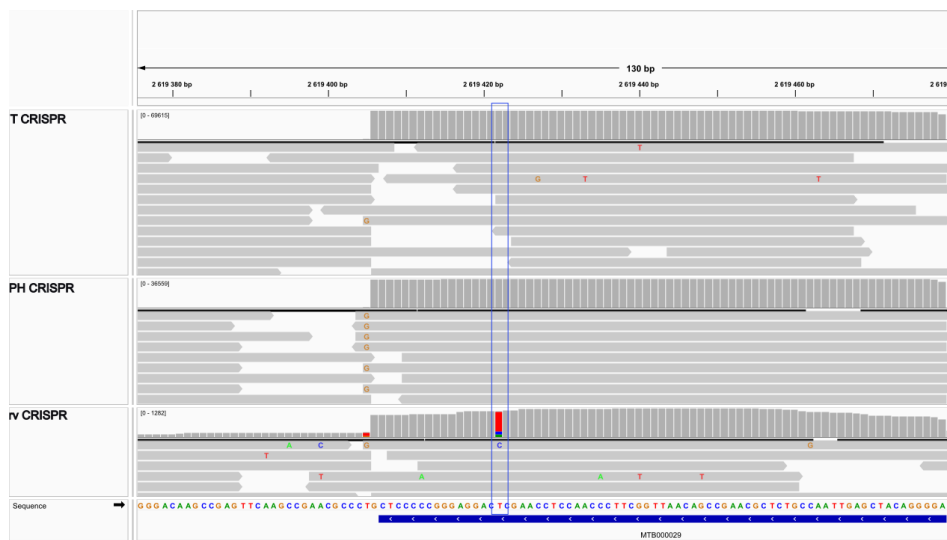
Tabela 5.6.7. Analiza transkryptomyczna mutantu *rnT_{MtbCas9}* - wybrane największe różnice.

gen	produkt	różnica ΔrnT
MTB000029	asnT tRNA-Asn (GTT)	5,081816832
MTB000005	tyrT tRNA-Tyr (GTA)	4,036101324
MTB000050	serU tRNA-Ser (TGA)	3,849027926
MTB000017	leuX tRNA-Leu (TAA)	3,349638444
MTB000004	glyU tRNA-Gly (CCC)	2,40517797
MTB000018	argV tRNA-Arg (CCG)	2,363244878
MTB000036	glyT tRNA-Gly (GCC)	2,220071723
MTB000031	glyV tRNA-Gly (TCC)	1,928116408
MTB000048	argU tRNA-Arg (ACG)	1,893422255
MTB000037	cysU tRNA-Cys (GCA)	1,648568309
MTB000027	valV tRNA-Val (TAC)	1,608729517
MTB000047	serX tRNA-Ser (CGA)	1,564339798
MTB000045	proY tRNA-Pro (CGG)	1,552649065
MTB000013	pheU tRNA-Phe (GAA)	1,548216902
MTB000034	lysU tRNA-Lys (CTT)	1,523730218
MTB000016	glnT tRNA-Gln (TTG)	-1,736951812

A



B



Rycina 5.6.8. Obraz transkryptów kodujących (A) tRNA-Gln (TTG) – brak metylacji 57 nukleotydu u mutantu *rnPH*- CRISPR oraz (B) tRNA-Asn (GTT) – brak metylacji 58 nukleotydu u mutantu *rnPHMtbCas9* i *rnTmCas9*

Przeprowadzone analizy transkryptomocjne mutantów o obniżonej ekspresji RNaz T oraz PH potwierdzają ich rolę w procesie dojrzewania 3'-końca cząsteczek tRNA oraz obrazują na poziomie molekularnym zmiany zachodzące w tym procesie.

6. Dyskusja

Nukleotydylotransferaza tRNA jest enzymem niezbędnym u wszystkich bakterii posiadających przynajmniej jeden rodzaj tRNA pozbawiony terminalnej sekwencji CCA na poziomie genu. Zaobserwowano, że u *E. coli*, pomimo, że wszystkie rodzaje tRNA kodują terminalną sekwencję CCA, inaktywacja tego enzymu prowadzi do znacznych defektów wzrostu bakterii (Zhu & Deutscher, 1987). Prątki gruźlicy posiadają 45 genów kodujących tRNA, 32 z tych genów nie zawiera sekwencji CCA. U *M. tuberculosis* jedynym znanym przedstawicielem nadrodziny nukleotydylotransferaz, obejmującej polimerazy poli(A) i nukleotydylotransferazy tRNA jest białko Rv3907c (Martin & Keller, 1996). Białko Rv3907c opisano w bazach danych jako polimeraza poli(A) (PAPI). Jednakże szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowej Rv3907c jasno wskazuje, że białko to powinno zostać zakwalifikowane jako nukleotydylotransferaza tRNA odpowiedzialna za syntezę terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA. Gen *rv3907c* został zaklasyfikowany w globalnych analizach mutagenyzy transpozonowej (TRASH) jako niezbędny w warunkach *in vitro*. Badania naszego zespołu z zastosowaniem metod homologicznej rekombinacji potwierdziły tę obserwację dla prątków gruźlicy oraz wykazały niezbędność jego ortologa również w saprofitycznym szczepie *M. smegmatis*. Przeprowadzone badania, pokazują, że gen *rv3907c* *M. tuberculosis* jest funkcjonalny w komórkach *M. smegmatis*, pozbawionych jego ortologa. Dodatkowo wykazano, że mutacja w domenie HD (HD/AA) wpływa na przeżywalność *M. smegmatis* inaktywując niezbędną dla wzrostu funkcjonalność badanego enzymu (Błaszczuk i wsp., praca w recenzji). Ponadto nasze badania z oczyszczonym enzymem Rv3907c pozwoliły zaobserwować aktywność nukleotydylotransferazy tRNA badanego białka w warunkach *in vitro*. Pytanie, na które chcieliśmy odpowiedzieć w ramach realizacji pracy doktorskiej dotyczyło aktywności białka Rv3907c w komórkach prątków. Ze względu na niezbędność białka dla przeżycia mykobakterii oraz brak skutecznych systemów kontrolujących poziom ekspresji u prątków postanowiliśmy wykorzystać adaptowany do mykobakterii system CRISPR-Cas9 (Rock i in., 2017), który wcześniej z powodzeniem wykorzystywaliśmy do obniżenia ekspresji innych białek *M. tuberculosis* (Korycka-Machała i in., 2020, 2022). System ten pozwalana na indukowaną inhibicję procesu transkrypcji danego genu obniżając ilość dostępnego mRNA oraz biosyntezę białka.

W badaniach opisanych w pracy doktorskiej indukcja anhydrotetracykliną (aTc) powodowała ponad 90% spadek ilości mRNA oraz białka, co przekładało się na zahamowanie wzrostu *M. tuberculosis* zarówno na bogatych jak i ubogich podłożach, a także w środowisku kwaśnym oraz z obniżonym poziomem tlenu. Globalna analiza transkryptomyczna przeprowadzona dla mutantów z deplecją badanego enzymu jednoznacznie wskazała na indukowane zaburzenia w dojrzewaniu i/lub syntezie różnych rodzajów tRNA oraz akumulacji niedojrzałych cząsteczek tRNA wydłużonych zarówno na końcu 5' jak i 3'. Transkrypty tRNA wydłużone od końca 5' sugerują, że proces dojrzewania tRNA u prątków jest ściśle uporządkowany, a obróbka 5' końca wymaga wcześniejszej obróbki końca 3'. Bezpośrednim dowodem *in vivo* na aktywność badanego enzymu był spadek ilościowy w liczbie cząsteczek tRNA zawierających terminalną sekwencję CCA w porównaniu do szczepu dzikiego. Różnic tych nie obserwowano dla sekwencji C, gdyż ten nukleotyd jest zazwyczaj kodowany w DNA, natomiast obecność sekwencji CC i CCA była w znacznym stopniu zależna od obecności badanego enzymu. Oczywiście, analizując transkryptom szczepu mutantu *ccaMtbCas9* nie spodziewaliśmy się efektu całkowitej eliminacji dojrzałych tRNA, gdyż już niewielki deficyt w pojedynczych rodzajach funkcjonalnych tRNA wyrażał się istotnym zahamowaniem wzrostu. Obserwowany efekt zahamowania dojrzewania cząsteczek tRNA był przez nas przewidywany biorąc pod uwagę obserwowaną aktywność enzymu w warunkach *in vitro*. Znacznie bardziej niespodziewaną obserwacją była bardzo istotna akumulacja poliadenylowanych transkryptów, w tym również transkryptów tRNA, w mutancie z obniżonym poziomem *ccaMtbcas9*. Globalne badania poliadenylacji transkryptów u bakterii są w dużej mierze niejednoznaczne (Adilakshmi i in., 2000). W standardowej bibliotece bakteryjnych transkryptomów RNASeq poliadenylacja jest praktycznie niewidoczna i może być obserwowana wyłącznie po selekcji poliadenylowanych odczytów (reads) z połączonych wspólnie ogromnych ilości danych z różnych sekwencjonowań.

U bakterii, w odróżnieniu od organizmów eukariotycznych, poliadenylacja transkryptów jest sygnałem do rozpadu RNA (Mohanty & Kushner, 2019). W naszych analizach mogliśmy wyraźnie zauważyć, że wśród odczytów silnie poliadenylowanych są odczyty kodujące przedwczesne, nieprzetworzone cząsteczki tRNA, które były silnie

akumulowane w warunkach deplecji CCA_{Mtb}. Opierając się na heterogenności znaczników poliadenylacji, doszliśmy do wniosku, że te addycje o długości kilku nukleotydów mogły w rzeczywistości być wytwarzane przez inny enzym, a nie CCA_{Mtb}, w znacznej mierze usunięty z komórki. Enzymem zdolnym do syntezy sekwencji poli(A) w cząsteczkach RNA jest PNPaza, kolejny niezbędny enzym biorący udział zarówno w dojrzewaniu, jak i degradacji RNA (Płociński i in., 2019). Zakładamy, że niedobór CCA_{Mtb} wpływa na dojrzewanie końców 3' tRNA, które są następnie znakowane do rozpadu lub dalej przetwarzane przez PNPazę jako składnik degradosomu RNA (Płociński i in., 2019). Rola PNPazy w poliadenylacji licznych RNA została potwierdzona poprzez jednoczesne wyciszenie obu genów. Deplecja PNPazy w mutancie zubożonym w CCA_{Mtb} hamowała poliadenylację transkryptów RNA jednoznacznie wskazując, że enzym ten odpowiada za obserwowane przez nas zjawisko. W fizjologicznym stężeniu Pi fosforylaza polinukleotydowa (PNPaza), jako składnik degradosomu RNA, bierze udział w degradacji RNA. Z drugiej strony raportowano, że PNPaza syntetyzuje długie, wysoce heteropolimeryczne ogony w warunkach *in vivo*. Ponadto izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, klonowanie i sekwencjonowanie pozwoliły zidentyfikować ogony poli(A) w *E. coli* z niedoborem polimerazy poli(A) (Mohanty & Kushner, 2000). Wskazywano także, że fosforylaza polinukleotydowa może przejąć funkcję eubakteryjnej poliadenylazy (Rott i in., 2003; Yehudai-Resheff i in., 2001). Nie możemy również wykluczyć, że akumulacja poliadenylowanych sekwencji RNA może być zaangażowana w gromadzenie energii podobnie jak obserwujemy to u eukariontów. Niefunkcjonalne transkrypty, mogły potencjalnie zostać zachowane w komórce do dalszego przetwarzania w przyszłych, sprzyjających warunkach. Ponieważ poziomy składników degradosomu RNA pozostały w dużej mierze niezmiennione w szczepie z obniżonym poziomem CCA_{Mtb}, wydaje się, że nastąpiło raczej przekształcenie PNPazy w polimerazę, a nie w nukleazę jako komponentu degradosomu. Takie mechanizmy mogą być korzystne dla przeżycia patogenów wewnątrzkomórkowych, takich jak *M. tuberculosis*.

Transferowe RNA (tRNA) są niezbędnymi składnikami biorącymi udział w syntezie białek komórkowych. W warunkach stresowych, niektóre tRNA ulegają przecięciu, tworząc cząsteczki działające jako regulatory ekspresji genów (Asadi-Atoi i in., 2019). Wszystkie transkrypty tRNA muszą ulec rozległej obróbce potranskrypcyjnej na końcach

5' i 3', aby uzyskać pełną funkcjonalność. Dojrzewanie końców 5' pre-tRNA odbywa się przy udziale RNazy P, natomiast w dojrzewaniu 3' końców zaangażowany jest szereg różnych rybonukleaz (Mohanty i in., 2022). U *E. coli*, gdzie wszystkie tRNA posiadają terminalną sekwencję CCA w obrębie kodujących je genów, obróbka 3' końca ma za zadanie usunięcie dodatkowych nukleotydów oraz ekspozycję sekwencji CCA dla syntetazy aminoacylo tRNA. Obecny w komórkach *E. coli* enzym o aktywności tRNA nukleotydylotransferazy może naprawić uszkodzoną terminalną sekwencję CCA lub dosyntetyzować dodatkową sekwencję CCA do uszkodzonych tRNA, które w dalszej kolejności ulegają degradacji (Wellner, Czech, i in., 2018). Enzymami odpowiedzialnymi za „uwolnienie” terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA u *E. coli* są RNaza PH, T, RNaza R, RNaza D i RNaza II. U *B. subtilis*, gdzie tylko część cząsteczek tRNA posiada terminalną sekwencję CCA w obrębie kodujących je genów w obróbkę 3' końca tRNA zaangażowane są RNazy PH, RNaza R, Yham w przypadku tRNA zawierających kodowaną sekwencję CCA, oraz RNaza Z odcinająca podczas dojrzewania tRNA sekwencję od końca 3' bezpośrednio za nukleotydem (discriminatory nucleotide) do którego ma być dosyntetyzowana sekwencja CCA poprzez nukleotydylotransferazę tRNA (Bechhofer & Deutscher, 2019; Perwez & Kushner, 2006). Liczba enzymów zaangażowana w obróbkę 3'-końca tRNA oraz zazwyczaj niewielki efekt fenotypowy obserwowany u mutantów pozbawionych poszczególnych enzymów wskazuje, że proces dojrzewania 3'-końca tRNA może być prowadzony przez więcej niż jeden enzym (Braun & Condon, 2014; Zuo i in., 2005). Ponadto w dojrzewanie 3'-końca, w przypadku braku dostępności dedykowanych do tego celu egzonukleaz, mogą być również zaangażowane takie enzymy jak PNPaza, RNazall, RNaza BN (Braun & Condon, 2014; Pellegrini i in., 2003). W proteomie mykobakterii identyfikujemy cztery (*M. tuberculosis*) lub pięć (*M. smegmatis*) enzymów potencjalnie zaangażowanych w obróbkę nukleolityczną 3'-końca tRNA posiadającego lub nieposiadającego sekwencję CCA. Uzyskane przez nas rekombinowane białka oraz ocena ich aktywności *in vitro*, wskazywały RNazę T jako potencjalny enzym, który w sposób specyficzny może usuwać nadmiarowe nukleotydy na końcu 3' cząsteczek tRNA. Ponadto, aktywność egzonukleazy w stosunku do 3'-końca tRNA wykazywała także RNaza PH, oraz RNaza Z1, ale dodatkowo enzymy te posiadały aktywność endonukleazy w obrębie jednoniciowej sekwencji RNA. O kluczowym znaczeniu RNazy T dla dojrzewania tRNA u mykobakterii może świadczyć także fakt, że

była to jedyna badana RNaza, której brak spowodował zauważalny efekt fenotypowy w postaci zahamowania wzrostu *M. smegmatis*. Efektu zahamowania wzrostu nie obserwowano u mutantów pozbawionych innych badanych RNaz tak długo jak w komórkach znajdował się funkcjonalny gen kodujący RNazę T. Niewielki efekt fenotypowy obserwowano tylko w przypadku równoczesnej inaktywacji obu RNaz Z co może wynikać z zaangażowania tych enzymów w dojrzewanie innych niż w przypadku RNazy T cząsteczek tRNA, których geny nie kodują terminalnej sekwencji CCA. Można więc założyć, że u mykobakterii głównymi, lecz nie niezbędnymi, egzonukleazami uczestniczącymi w procesie dojrzewania tRNA są RNaza T oraz RNaza Z, a przygotowane przez nie końce kontroluje, naprawia, lub uzupełnia o sekwencję CCA, nukleotydylotransferaza tRNA. Silna deplecja enzymu CCA_{Mtb} u mykobakterii spowodowała akumulację niedojrzałych cząsteczek tRNA o długości pozwalającej na ich detekcję w standardowych bibliotekach RNA. Zjawiska takiego nie zaobserwowaliśmy natomiast po całkowitej inaktywacji (delecja genów, *M. smegmatis*) bądź deplecji (CRISPR-Cas9, *M. tuberculosis*) badanych RNaz. Można więc zakładać, że RNaza T oraz RNaza PH uczestniczą dopiero w końcowych etapach obróbki transkryptów tRNA i usuwają niewielką liczbę nukleotydów na 3'-końcu tRNA, które nie są wydajnie usuwane przez enzymy działające na wcześniejszych etapach procesu dojrzewania tRNA. Ponadto, akumulacja niedojrzałych tRNA w mutancie $CCA_{Mtbcas9}$ sugeruje, że albo enzym ten jest zaangażowany również na wcześniejszych etapach procesu dojrzewania tRNA, bądź też akumulacja niedojrzałych tRNA pozbawionych terminalnej sekwencji CCA spowalnia wczesne etapy dojrzewania tRNA. Za tym pierwszym mechanizmem mogłaby świadczyć obserwowana w naszym laboratorium, w warunkach *in vitro*, aktywność enzymu CCA_{Mtb} jako egzonukleazy w stosunku do tRNA o wydłużonym 3'-końcu (Błaszczuk i wsp., praca w recenzji). Szczegółowa analiza transkryptów uzyskanych w procesie sekwencjonowania bibliotek małych RNA badanych mutantów pozwoliła na potwierdzenie *in vivo* aktywności enzymu CCA_{Mtb} jako enzymu syntetyzującego terminalną sekwencję CCA w cząsteczkach tRNA. Ocena liczby transkryptów z sekwencją CCA oraz bez tej sekwencji u mutantów i szczepu kontrolnego jasno wskazała na rolę badanego enzymu. W przypadku deplecji RNaz PH i T zaobserwowano nadprodukcję wielu rodzajów tRNA w komórkach prątków gruźlicy a szczegółowa analiza transkryptów wykazała, że są one zazwyczaj niekompletne i zawierają wyłącznie fragment 5', do

momentu pętli antykodonu. Taki niepełny transkrypt mógłby powstać w wyniku zatrzymania procesu transkrypcji, lub co bardziej prawdopodobne w tym przypadku, cięcia w obrębie pętli antykodonu i degradacji niefunkcjonalnych cząsteczek tRNA. Należy również zauważyć, że u mutantów *rnT_{Mtbcas9}* i *rnPH_{Mtbcas9}* często zanikają transkrypty dla obszaru poniżej genu tRNA, które są wyraźnie widoczne w szczepie kontrolnym, ale znaczenie tego zjawiska trudno wyjaśnić na podstawie naszych dotychczasowych analiz. W warunkach deplecji RNazy PH lub T można było również zaobserwować brak charakterystycznej dla cząsteczek tRNA metylacji nukleotydu 57/58 powstającej podczas obróbki posttranskrypcyjnej. Enzymem zaangażowanym w proces metylacji u *E. coli* są metylotransferazy tRNA. U *Saccharomyces cerevisiae* dynamiczne modyfikacje tRNA umożliwiają regulację ekspresji genów podczas translacji w celu zapewnienia lepszej adaptacji do warunków stresowych (Galvanin i in., 2020). Ponadto warunki niedotlenienia indukują modyfikacje w trzecim nukleotydzie kodonu tRNA Thr *M. bovis*, regulując w ten sposób translację (Chionh i in., 2016). Zahamowanie procesu metylacji tych cząsteczek może wynikać z zahamowania procesu dojrzewania tRNA u mutantów z obniżonym poziomem enzymu RNazy PH. Analiza transkryptów tRNA w mutantach *rnT_{Mtbcas9}* / *rnPH_{Mtbcas9}* nie pozwoliła na identyfikację ilościowej różnicy w liczbie transkryptów zawierających terminalną sekwencję CCA w porównaniu do szczepu kontrolnego. Wskazuje to, że podobnie jak u *B. subtilis* (Pellegrini i in., 2003), obróbka 3'-końca tRNA wymagających posttranskrypcyjnej syntezy terminalnej sekwencji CCA nie jest prowadzona przez RNazę PH lub T a przez endonukleazę Z.

Niezwykle interesującą obserwacją podczas analizy danych transkryptomicznych była intensywne akumulacja poliadenylowanych transkryptów u mutantu z obniżonym poziomem enzymu *CCA_{Mtb/Msm}*. Konstrukcja podwójnego mutantu pozwalającego na równoczesną deplecję enzymu CCA i PNPazy wskazała jednoznacznie, że za proces ten odpowiada składnik degradosomu – PNPaza. Biorąc pod uwagę rolę poliadenylacji u Prokariota, będącej sygnałem dla degradacji niefunkcjonalnych transkryptów można było założyć, że niefunkcjonalne tRNA, pozbawione terminalnej sekwencji CCA ulegają poliadenylacji przez PNPazę i dalszej degradacji. Można byłoby zatem spodziewać się, że mutanty z obniżonym poziomem (lub inaktywacją) RNaz T czy PH będą również, choćby w mniejszym zakresie, akumulować poliadenylowane cząsteczki tRNA. Takiej akumulacji

jednak nie zauważono zarówno u mutantów *M. tuberculosis*, jak i *M. smegmatis*. Może to sugerować, że poliadenylacji ulegają tylko te cząsteczki tRNA, które są substratem dla nukleotydylotransferazy tRNA a jednocześnie są pozbawione tego enzymu. Obserwacje te mogą wynikać ze współzawodnictwa PNPazy oraz nukleotydylotransferazy tRNA o wiązanie tRNA, a w przypadku deplecji tego ostatniego może dochodzić do nieograniczonej poliadenylacji tych transkryptów. Więcej informacji o tym procesie można byłoby uzyskać po badaniu transkryptomu u mutantu pozbawionego RNaz Z i/lub nukleotydylotransferazy tRNA.

7. Wnioski

1. Rv3907c jest enzymem o aktywności nukleotydolotransferazy tRNA zaangażowanym w niezbędny proces syntezy terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA u mykobakterii.
2. Zahamowanie możliwości syntezy terminalnej sekwencji CCA w cząsteczkach tRNA u mykobakterii prowadzi do ich poliadenylacji zależnej od obecności PNPazy.
3. Główną, lecz nie niezbędną egzonukleazą uczestniczącą w procesie dojrzewania 3' końca-tRNA u prątków jest RNaza T.

8. Streszczenie

Ponad połowa tRNA syntetyzowanych przez *Mycobacterium tuberculosis* wymaga dodania terminalnej sekwencji cytozyna-cytozyna-adenina (CCA), niezbędnej dla funkcjonalności aminoacylo-tRNA. Proteom mykobakterii musi zatem posiadać enzym o aktywności nukleotydylotransferazy tRNA (enzym dodający sekwencję CCA). Dojrzewanie 3' końca tRNA u bakterii odbywa się między innymi przy udziale egzonukleaz z nadrodziny DnaQ. Nadrodzina DnaQ obejmuje enzymy przetwarzające DNA i RNA, takie jak domeny korekcyjne polimeraz DNA, inne egzonukleazy DNA, RNaza D, RNaza T, oligorybonukleaza i egzonukleazy RNA. W proteomie *M. tuberculosis* zidentyfikowano cztery (Rv1340 – RNazaPH; Rv2179c – RNaza T; Rv2407 – RNaza Z; Rv2681 – RNaza D) a w proteomie *M. smegmatis* pięć (Msmeg_4568 – RNaza Z1; Msmeg_1776 – RNaza Z2; Msmeg_4901 – RNaza PH; Msmeg_2778 – RNaza D; Msmeg_4245 – RNaza T) RNaz z nadrodziny DEDD.

Celem niniejszej pracy doktorskiej była identyfikacja oraz charakterystyka enzymów uczestniczących w procesie dojrzewania 3' końca cząsteczek tRNA u mykobakterii.

Pierwszy etap pracy obejmował identyfikację enzymu o aktywności nukleotydyloytransferazy tRNA w proteomie mykobakterii. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wskazywała, że enzymem o takiej aktywności powinien być produkt genu *rv3907c*. Aby zweryfikować eksperymentalnie postawioną hipotezę skonstruowano rekombinowane szczepy *M. smegmatis* oraz *M. tuberculosis* charakteryzujące się obniżonym poziomem potencjalnych enzymów CCA_{Mtb} oraz CCA_{Msm}. Analiza RNA Seq wykazała akumulację 18 rodzajów tRNA (z 45 wszystkich rodzajów identyfikowanych u *M. tuberculosis*). Wiele z cząsteczek tRNA u szczepów mutantów charakteryzowało się także brakiem terminalnej sekwencji CCA. Ponadto niedojrzałe cząsteczki tRNA, które nagromadziły się po obniżeniu poziomu ekspresji CCA_{Mtb}, były silnie poliadenylowane. Enzymem, który oprócz polimerazy poli(A), może być odpowiedzialny za proces poliadenylacji w komórkach bakteryjnych jest PNPaza (nukleotydylotransferaza polirybonukleotydomowa) kodowana przez *gps1*. W celu zbadania czy za zjawisko poliadenylacji transkryptów przy niedoborach enzymu CCA_{Mtb} u mykobakterii odpowiada PNPaza przygotowano szczep o obniżonej ekspresji

równocześnie dwóch genów, *cca_{MtbCas9}* oraz *gps1_{MtbCas9}*. Analizy sekwencjonowania (RNAseq), wykazały, że zjawisko poliadenylacji transkryptów obserwowane jest wyłącznie dla szczepu o obniżonym poziomie enzymu CCA_{Mtb}, ale tylko w obecności niezaburzonej ekspresji genu *gps1*. Tak więc jednoznacznie wykazano, że za obserwowane zjawisko poliadenylacji przy niedoborach CCA_{Mtb} odpowiada enzym PNPaza.

Kolejnym etapem pracy było poznanie funkcji egzonukleaz zaangażowanych w dojrzewanie 3' końca tRNA u mykobakterii. W tym celu skonstruowano szereg pojedynczych i wielokrotnych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących *rnPH*, *rnT*, *rnZ1*, *rnZ2*, *rnD*, oraz oczyszczono rekombinowane białka w systemie heterologicznym *E. coli*. Ocena aktywności badanych enzymów *M. smegmatis* pozwoliła na wnioskowanie, że u mykobakterii główną, lecz nie niezbędną, egzonukleazą uczestniczącą w procesie dojrzewania 3' końca tRNA jest RNaza T. Analiza transkryptomyczna wykazała, że w przypadku deplecji RNaz PH i T dochodzi do nadprodukcji wielu rodzajów tRNA w komórkach prątków gruźlicy a szczegółowa analiza transkryptów ujawniła, że są one zazwyczaj niekompletne i zawierają wyłącznie fragment 5' cięty w obszarze pętli antykodonu.

Uzyskane wyniki jednoznacznie dowodzą, że Rv3907c pełni u mykobakterii niezbędną funkcję nukleotydylotransferazy tRNA i może być rozpatrywany jako atrakcyjne miejsce docelowe dla nowych tuberkulostatyków. Wykazano także, że PNPaza będąca istotnym komponentem degradosomu u mykobakterii jest również odpowiedzialna za poliadenylację transkryptów, przynajmniej w warunkach niedoboru enzymu CCA_{Mtb}. Konstrukcja i analiza mutantów pozbawionych wybranych egzonukleaz z nadrodziny DnaQ wskazała na istotną rolę RNazy T w procesie dojrzewania tRNA u mykobakterii i pozwoliła zaobserwować zjawisko nukleolitycznego cięcia tRNA w obszarze pętli antykodonu w warunkach niedoboru tego enzymu.

9. Abstract

More than half of the tRNAs synthesized by *Mycobacterium tuberculosis* require the addition of a terminal cytosine-cytosine-adenine (CCA) sequence, necessary for tRNA to be aminoacylated. The mycobacterial proteome must therefore possess an enzyme with tRNA nucleotidyl transferase activity (CCA-adding enzyme). The maturation of the 3' end of tRNA in bacteria takes place with the participation of exonucleases from the DnaQ superfamily. The DnaQ superfamily consists of DNA and RNA processing enzymes such as the proofreading domains of DNA polymerases, other DNA exonucleases, RNase D, RNase T, oligoribonuclease and RNA exonucleases. Four have been identified in the *M. tuberculosis* proteome (Rv1340 – RNazaPH; Rv2179c – RNaza T; Rv2407 – RNaza Z; Rv2681 – RNaza D) and five in the *M. smegmatis* proteome (Msmeg_4568 – RNaza Z1; Msmeg_1776 – RNaza Z2; Msmeg_4901 – RNaza PH; Msmeg_2778 – RNaza D; Msmeg_4245 – RNaza T) RNases from DEDD superfamily.

The aim of this doctoral thesis was to identify and characterize the enzymes involved in the maturation of the 3' end of tRNA molecules in mycobacteria.

The first stage of the work involved the identification of an enzyme with tRNA nucleotidyl transferase activity in the mycobacterial proteome. The performed bioinformatic analysis indicated that the product of the *rv3907c* gene should be an enzyme with such activity. In order to experimentally verify the hypothesis, recombinant strains of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* were constructed, characterized by a reduced protein level of the potential enzymes CCA_{Mtb} and CCA_{Msm}. RNA Seq analysis showed the accumulation of 18 tRNA species (out of all 45 identified in *M. tuberculosis*). Many of the tRNA molecules in the mutant strains also lacked the terminal CCA sequence. In addition, immature tRNAs that accumulated after downregulation of CCA_{Mtb} expression were highly polyadenylated. The enzyme that, apart from poly(A) polymerase, may be responsible for the polyadenylation process in bacterial cells is PNPase (polyribonucleotide nucleotidyl transferase) encoded by *gps1*. In order to investigate whether PNPase is responsible for the phenomenon of polyadenylation of transcripts in CCA_{Mtb} enzyme deficiency in mycobacteria, a strain with reduced expression of two genes simultaneously, *cca_{Mtb}Cas9* and *gps1_{Mtb}Cas9*, was prepared.

Sequencing analyzes (RNAseq) showed that the phenomenon of polyadenylation of transcripts is observed only in the strain with a reduced level of the CCA_{Mtb} enzyme, but only in the presence of undisturbed expression of the *gps1* gene. Thus, it has been unequivocally demonstrated that the PNPase is responsible for the observed phenomenon of polyadenylation in CCA_{Mtb} deficiencies.

The next stage of the work was to learn the function of exonucleases involved in the maturation of the 3' end of tRNA in mycobacteria. For this purpose, a series of *M. smegmatis* single and multiple mutants lacking functional genes encoding rnPH, rnT, rnZ1, rnZ2, rnD were constructed and recombinant proteins were purified in an *E. coli* heterologous system. Evaluation of the activity of the tested enzymes *M. smegmatis* allowed to conclude that in mycobacteria the main, but not essential, exonuclease involved in the 3' end maturation of tRNA is RNase T. Transcriptomic analysis showed that in the case of depletion of RNase PH and T, many types of tRNAs are overproduced in *Mycobacterium tuberculosis* cells, and detailed analysis of the transcripts showed that they are usually incomplete and contain only the 5' fragment, until the anticodon loop.

The obtained results clearly prove that Rv3907c performs the necessary function of tRNA nucleotidyl transferase in mycobacteria and can be considered as an attractive target for new antituberculosis drugs. It has also been shown that PNPase, which is an essential component of the degradosome in mycobacteria, is also responsible for the polyadenylation of transcripts, at least under conditions of CCA_{Mtb} enzyme deficiency. The construction and analysis of mutants lacking selected exonucleases from the DnaQ superfamily indicated the important role of RNase T in the process of tRNA maturation in mycobacteria and allowed to observe the phenomenon of nucleolytic cleavage of tRNA in the area of the anticodon loop in the absence of this enzyme.

10. Literatura

- Adilakshmi, T., Ayling, P. D., & Ratledge, C. (2000). Polyadenylation in mycobacteria: Evidence for oligo(dT)-primed cDNA synthesis. *Microbiology (Reading, England)*, *146* (Pt 3), 633–638. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-3-633>
- Arnvig, K. B., Comas, I., Thomson, N. R., Houghton, J., Boshoff, H. I., Croucher, N. J., Rose, G., Perkins, T. T., Parkhill, J., Dougan, G., & Young, D. B. (2011). Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, *7*(11), e1002342. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002342>
- Arnvig, K. B., Cortes, T., & Młody, D. B. (2014). Noncoding RNA in Mycobacteria. *Microbiology Spectrum*, *2*(2), 2.2.04. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0029-2013>
- Asadi-Atoi, P., Barraud, P., Tisne, C., & Kellner, S. (2019). Benefits of stable isotope labeling in RNA analysis. *Biological Chemistry*, *400*(7), 847–865. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0447>
- Babitzke, P., Lai, Y.-J., Renda, A. J., & Romeo, T. (2019). Posttranscription Initiation Control of Gene Expression Mediated by Bacterial RNA-Binding Proteins. *Annual review of microbiology*, *73*, 43–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115907>
- Bandyra, K. J., & Luisi, B. F. (2013). Licensing and due process in the turnover of bacterial RNA. *RNA Biology*, *10*(4), 627–635. <https://doi.org/10.4161/rna.24393>

- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 4(3), 267–278.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1159>
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Bechhofer, D. H., & Deutscher, M. P. (2019). Bacterial ribonucleases and their roles in RNA metabolism. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 54(3), 242–300. <https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1651816>
- Beisel, C. L., & Storz, G. (2010). Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(5), 866–882.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00241.x>
- Bloch, S., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., & Nejman-Faleńczyk, B. (2017). Small and Smaller—sRNAs and MicroRNAs in the Regulation of Toxin Gene Expression in Prokaryotic Cells: A Mini-Review. *Toxins*, 9(6), 181.
<https://doi.org/10.3390/toxins9060181>
- Boehm, A., & Vogel, J. (2012). The csgD mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. *Molecular Microbiology*, 84(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08033.x>
- Bossi, L., & Figueroa-Bossi, N. (2016). Competing endogenous RNAs: A target-centric view of small RNA regulation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(12), 775–784. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.129>

- Brantl, S., & Jahn, N. (2015). SRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(3), 413–427.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv003>
- Braun, F., & Condon, C. (2014). RNA Processing☆. W T. M. Schmidt (Red.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (s. 164–177). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02455-7>
- Buskila, A. A., Kannaiah, S., & Amster-Choder, O. (2014). RNA localization in bacteria. *RNA Biology*, *11*(8), 1051–1060. <https://doi.org/10.4161/rna.36135>
- Chionh, Y. H., McBee, M., Babu, I. R., Hia, F., Lin, W., Zhao, W., Cao, J., Dziergowska, A., Malkiewicz, A., Begley, T. J., Alonso, S., & Dedon, P. C. (2016). tRNA-mediated codon-biased translation in mycobacterial hypoxic persistence. *Nature Communications*, *7*, 13302. <https://doi.org/10.1038/ncomms13302>
- Coskun, F. S., Płociński, P., & van Oers, N. S. C. (2021). Small RNAs Asserting Big Roles in Mycobacteria. *Non-Coding RNA*, *7*(4), 69.
<https://doi.org/10.3390/ncrna7040069>
- Darfeuille, F., Unoson, C., Vogel, J., & Wagner, E. G. H. (2007). An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular Cell*, *26*(3), 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.003>
- DebRoy, S., Gebbie, M., Ramesh, A., Goodson, J. R., Cruz, M. R., van Hoof, A., Winkler, W. C., & Garsin, D. A. (2014). Riboswitches. A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6199), 937–940.
<https://doi.org/10.1126/science.1255091>

- Dutta, T., Malhotra, A., & Deutscher, M. P. (2012). Exoribonuclease and endoribonuclease activities of RNase BN/RNase Z both function in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(42), 35747–35755.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407403>
- Felden, B., & Augagneur, Y. (2021). Diversity and Versatility in Small RNA-Mediated Regulation in Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 719977.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.719977>
- Galvanin, A., Vogt, L.-M., Grober, A., Freund, I., Ayadi, L., Bourguignon-Igel, V., Bessler, L., Jacob, D., Eigenbrod, T., Marchand, V., Dalpke, A., Helm, M., & Motorin, Y. (2020). Bacterial tRNA 2'-O-methylation is dynamically regulated under stress conditions and modulates innate immune response. *Nucleic Acids Research*, *48*(22), 12833–12844. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1123>
- Hajnsdorf, E., & Kaberdin, V. R. (2018). RNA polyadenylation and its consequences in prokaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1762), 20180166. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0166>
- Hartkoorn, R. C., Sala, C., Uplekar, S., Busso, P., Rougemont, J., & Cole, S. T. (2012). Genome-wide definition of the SigF regulon in Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, *194*(8), 2001–2009. <https://doi.org/10.1128/JB.06692-11>
- Ibrahim, H., Wilusz, J., & Wilusz, C. J. (2008). RNA recognition by 3'-to-5' exonucleases: The substrate perspective. *Biochimica et biophysica acta*, *1779*(4), 256–265.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2007.11.004>

- Kavčič, B., Tkačik, G., & Bollenbach, T. (2020). Mechanisms of drug interactions between translation-inhibiting antibiotics. *Nature Communications*, *11*, 4013. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17734-z>
- Korycka-Machała, M., Kawka, M., Lach, J., Płocińska, R., Bekier, A., Dziadek, B., Brzostek, A., Płociński, P., Strapagiel, D., Szczesio, M., Gobis, K., & Dziadek, J. (2022). 2,4-Disubstituted pyridine derivatives are effective against intracellular and biofilm-forming tubercle bacilli. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1004632. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1004632>
- Korycka-Machała, M., Pawełczyk, J., Borówka, P., Dziadek, B., Brzostek, A., Kawka, M., Bekier, A., Rykowski, S., Olejniczak, A. B., Strapagiel, D., Witczak, Z., & Dziadek, J. (2020). PPE51 Is Involved in the Uptake of Disaccharides by Mycobacterium tuberculosis. *Cells*, *9*(3), 603. <https://doi.org/10.3390/cells9030603>
- Kuhn, C.-D., Wilusz, J. E., Zheng, Y., Beal, P. A., & Joshua-Tor, L. (2015). On-Enzyme Refolding Permits Small RNA and tRNA Surveillance by the CCA-Adding Enzyme. *Cell*, *160*(4), 644–658. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.005>
- Laalami, S., Zig, L., & Putzer, H. (2014). Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(10), 1799–1828. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1472-4>
- Li, Z., Gong, X., Joshi, V. H., & Li, M. (2005). Co-evolution of tRNA 3' trailer sequences with 3' processing enzymes in bacteria. *RNA (New York, N.Y.)*, *11*(5), 567–577. <https://doi.org/10.1261/rna.7287505>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Lovett, S. T. (2004). Exonucleases, Bacterial. W W. J. Lennarz & M. D. Lane (Red.), *Encyclopedia of Biological Chemistry* (s. 66–72). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-443710-9/00217-9>
- Martin, G., & Keller, W. (1996). Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases. *The EMBO Journal*, *15*(10), 2593–2603.
- Mellin, J. R., Koutero, M., Dar, D., Nahori, M.-A., Sorek, R., & Cossart, P. (2014). Riboswitches. Sequestration of a two-component response regulator by a riboswitch-regulated noncoding RNA. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6199), 940–943. <https://doi.org/10.1126/science.1255083>
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2000). Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' → 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(22), 11966–11971.
<https://doi.org/10.1073/pnas.220295997>
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2010). Bacterial/archaeal/organelle polyadenylation. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, *2*(2), 256–276.
<https://doi.org/10.1002/wrna.51>
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2018). Enzymes Involved in Posttranscriptional RNA Metabolism in Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Spectrum*, *6*(2), 6.2.24.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.RWR-0011-2017>
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2019). New Insights into the Relationship between tRNA Processing and Polyadenylation in *Escherichia coli*. *Trends in Genetics: TIG*, *35*(6), 434–445. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.03.003>

- Mohanty, B. K., Nichols, K., & Kushner, S. R. (2022). Maturation of the *E. coli* Glu2, Ile1, and Ala1B tRNAs utilizes a complex processing pathway. *Molecular Microbiology*, *118*(1–2), 30–46. <https://doi.org/10.1111/mmi.14949>
- Moore, A., Riesco, A. B., Schwenk, S., & Arnvig, K. B. (2017). Expression, maturation and turnover of DrrS, an unusually stable, DosR regulated small RNA in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174079>
- Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2015). Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: Impact on metabolism and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(3), 331–349. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv022>
- Pellegrini, O., Nezzar, J., Marchfelder, A., Putzer, H., & Condon, C. (2003). Endonucleolytic processing of CCA-less tRNA precursors by RNase Z in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, *22*(17), 4534–4543. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg435>
- Perwez, T., & Kushner, S. R. (2006). RNase Z in *Escherichia coli* plays a significant role in mRNA decay. *Molecular Microbiology*, *60*(3), 723–737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05124.x>
- 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>

- Ravishankar, S., Ambady, A., Swetha, R. G., Anbarasu, A., Ramaiah, S., & Sambandamurthy, V. K. (2016). Essentiality Assessment of Cysteinylyl and Lysyl-tRNA Synthetases of *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS ONE*, *11*(1), e0147188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147188>
- Régnier, P., & Hajnsdorf, E. (2013). The interplay of Hfq, poly(A) polymerase I and exoribonucleases at the 3' ends of RNAs resulting from Rho-independent termination. *RNA Biology*, *10*(4), 602–609. <https://doi.org/10.4161/rna.23664>
- Rock, J. M., Hopkins, F. F., Chavez, A., Diallo, M., Chase, M. R., Gerrick, E. R., Pritchard, J. R., Church, G. M., Rubin, E. J., Sasseti, C. M., Schnappinger, D., & Fortune, S. M. (2017). Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nature microbiology*, *2*, 16274. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.274>
- Rombouts, S., & Nollmann, M. (2021). RNA imaging in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *45*(2), fuaa051. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa051>
- Rott, R., Zipor, G., Portnoy, V., Liveanu, V., & Schuster, G. (2003). RNA polyadenylation and degradation in cyanobacteria are similar to the chloroplast but different from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(18), 15771–15777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211571200>
- Saliba, A.-E., C Santos, S., & Vogel, J. (2017). New RNA-seq approaches for the study of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, *35*, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.01.001>
- Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H., & Vogel, J. (2007). A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and

upstream of ribosome-binding sites. *Genes & Development*, 21(21), 2804–2817.

<https://doi.org/10.1101/gad.447207>

Sharma, C. M., Papenfort, K., Pernitzsch, S. R., Mollenkopf, H.-J., Hinton, J. C. D., &

Vogel, J. (2011). Pervasive post-transcriptional control of genes involved in

amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Molecular*

Microbiology, 81(5), 1144–1165. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

[2958.2011.07751.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07751.x)

Shepherd, J., & Ibbá, M. (2015). Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiology Reviews*,

39(3), 280–300. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv004>

Shippy, D. C., & Fadl, A. A. (2015). RNA modification enzymes encoded by the gid

operon: Implications in biology and virulence of bacteria. *Microbial*

Pathogenesis, 89, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.008>

Sinha, D., Matz, L. M., Cameron, T. A., & Lay, N. R. D. (2018). Poly(A) polymerase is

required for RyhB sRNA stability and function in *Escherichia coli*. *RNA*, 24(11),

1496. <https://doi.org/10.1261/rna.067181.118>

Šponer, J., Bussi, G., Krepl, M., Banáš, P., Bottaro, S., Cunha, R. A., Gil-Ley, A.,

Pinamonti, G., Pobleto, S., Jurečka, P., Walter, N. G., & Otyepka, M. (2018). RNA

Structural Dynamics As Captured by Molecular Simulations: A Comprehensive

Overview. *Chemical Reviews*, 118(8), 4177–4338.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00427>

TEJADA-ARRANZ, A., de CRECY-LAGARD, V., & DE REUSE, H. (2020). Bacterial RNA

degradosomes. *Trends in biochemical sciences*, 45(1), 42–57.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.10.002>

- Urbanowski, M. L., Stauffer, L. T., & Stauffer, G. V. (2000). The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 37(4), 856–868. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02051.x>
- Wagner, E. G. H., & Romby, P. (2015). Chapter Three - Small RNAs in Bacteria and Archaea: Who They Are, What They Do, and How They Do It. W T. Friedmann, J. C. Dunlap, & S. F. Goodwin (Red.), *Advances in Genetics* (T. 90, s. 133–208). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.05.001>
- Wellner, K., Betat, H., & Mörl, M. (2018). A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(4), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.012>
- Wellner, K., Czech, A., Ignatova, Z., Betat, H., & Mörl, M. (2018). Examining tRNA 3'-ends in *Escherichia coli*: Teamwork between CCA-adding enzyme, RNase T, and RNase R. *RNA*, 24(3), 361–370. <https://doi.org/10.1261/rna.064436.117>
- Yakunin, A. F., Proudfoot, M., Kuznetsova, E., Savchenko, A., Brown, G., Arrowsmith, C. H., & Edwards, A. M. (2004). The HD Domain of the *Escherichia coli* tRNA Nucleotidyltransferase Has 2',3'-Cyclic Phosphodiesterase, 2'-Nucleotidase, and Phosphatase Activities *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 36819–36827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405120200>
- Yang, W. (2011). Nucleases: Diversity of Structure, Function and Mechanism. *Quarterly reviews of biophysics*, 44(1), 1–93. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000181>

- Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M., & Schuster, G. (2001). Polynucleotide Phosphorylase Functions as Both an Exonuclease and a Poly(A) Polymerase in Spinach Chloroplasts. *Molecular and Cellular Biology*, 21(16), 5408–5416.
<https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5408-5416.2001>
- Yehudai-Resheff, S., & Schuster, G. (2000). Characterization of the E.coli poly(A) polymerase: Nucleotide specificity, RNA-binding affinities and RNA structure dependence. *Nucleic Acids Research*, 28(5), 1139–1144.
<https://doi.org/10.1093/nar/28.5.1139>
- Zhu, L., & Deutscher, M. P. (1987). TRNA nucleotidyltransferase is not essential for Escherichia coli viability. *The EMBO Journal*, 6(8), 2473–2477.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02528.x>
- Zuo, Y., Wang, Y., & Malhotra, A. (2005). Crystal structure of Escherichia coli RNase D, an exoribonuclease involved in structured RNA processing. *Structure (London, England: 1993)*, 13(7), 973–984. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.015>
- Zuo, Y., Zheng, H., Wang, Y., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Skarina, T., Savchenko, A., Malhotra, A., & Minor, W. (2007). Crystal structure of RNase T, an exoribonuclease involved in tRNA maturation and end turnover. *Structure (London, England: 1993)*, 15(4), 417–428.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2007.02.004>

