

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.