UNIWERSYTET RZESZOWSKI
Kolegium Nauk Przyrodniczych

Katarzyna Struś

Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: Nauki biologiczne

„Analiza funkcjonalna dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG6236/MSMEG6238 u *Mycolicibacterium smegmatis* *(Mycobacterium smegmatis)*”

Functional analysis of the two-component signal transduction system MSMEG6236/MSMEG6238 in *Mycolicibacterium smegmatis* (*Mycobacterium smegmatis*)

Praca wykonana w Laboratorium Molekularnych
Analiz Bakterii i Grzybów Uniwersytetu Rzeszowskiego
oraz w
Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium*
Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi
Promotor:
Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Promotor pomocniczy:
dr hab. n. med. Anna Żaczek, prof. UR

Rzeszów, 2023

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi

Panu prof. dr hab. Jarosławowi Dziadkowi,

za okazaną pomoc, życzliwość i wsparcie

podczas realizacji pracy doktorskiej

Podziękowania kieruję również do

Pani dr hab. n. med. Anny Żaczek, prof. UR

W szczególny sposób pragnę podziękować

całemu zespołowi

Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium,

a w szczególności

Pani dr Renacie Płocińskiej,

Pani dr Małgorzacie Koryckiej-Machała

za poświęcony czas, cierpliwość,

bezcenne sugestie i okazane wsparcie

na każdym etapie prowadzącym do powstania tej pracy.

Spis treści

Spis treści 3
Wykaz skrótów 7
1. Wstęp 9
1.1. Ogólna charakterystyka rodzaju *Mycobacterium* 9
1.2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Mycolicibacterium* 10
1.3. Gruźlica na świecie 11
1.4. Infekcja *M. tuberculosis* 12
1.5. Adaptacje bakterii do środowiska 12
1.5.1. Mechanizmy adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska 13
1.6. Regulacja ekspresji genów 14
1.6.1. Czynniki sigma 14
1.6.2. Czynniki transkrypcyjne 15
1.7. Metabolizm azotu i węgla 15
1.7.1. Metabolizm azotu u mykobakterii 15
1.7.2. Metabolizm węgla u mykobakterii 17
1.8. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału jako czynniki adaptacyjne do zmieniających się warunków środowiska 18
1.8.1. Kinaza histydynowa 19
1.8.2. Białko regulatorowe 20
1.8.3. TCSs u różnych gatunków bakterii 20
1.8.4. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału u mykobakterii 21
1.8.4.1. SenX3-RegX3 23
1.8.4.2. PhoP-PhoR 23
1.8.4.3. NarL-NarS 23
1.8.4.4. PrrA-PrrB 23
1.8.8.5. MprA-MprB 24
1.8.8.6. KdpD-KdpE 24
1.8.8.7. TrcR-TrcS 24
1.8.8.8. DosR-DosT (DosR-DosS) 25
1.8.8.9. PdtaR-PdtaS 25
1.8.8.10. Rv0600c – Rv0601c – Rv0602c 25
1.8.8.11. TcrX-TcrY 25
1.8.5. „Sieroce” białka regulatorowe 26
1.8.5.1. Rv0195 26
1.8.5.2. Rv0260c 26

1.8.5.3. Rv0818 26
1.8.5.4. Rv2884 27
1.8.5.5. Rv3143 27
1.8.5.6. „Sieroce” kinazy 28
1.9. Dwukomponentowy system transdukcji sygnału MnoSR 28
1.10. MtrA-MtrB 29
2. Cel badawczy 31
3. Materiały 32
3.1. Szczepy bakteryjne 32
3.2. Podłoża mikrobiologiczne 32
3.3. Czynniki selekcyjne dodawane do podłoży 34
3.4. Syntetyczne oligonukleotydy 34
3.5. Wektory plazmidowe 37
3.6. Enzymy 40
3.7. Mieszaniny reakcyjne 41
3.8. Bufory i roztwory 42
3.9. Żele wykorzystane do rozdziałów elektroforetycznych 45
3.10. Markery wielkości 45
3.11. Zestawy komercyjnych odczynników 46
3.12. Odczynniki chemiczne 47
3.13. Aparatura 50
4. Metody 51
4.1. Hodowle bakteryjne 51
4.1.1. Hodowle komórek *E. coli* 51
4.1.2. Hodowle *M. smegmatis* 51
4.2. Izolacja plazmidowego DNA 51
4.3. Izolacja chromosomalnego DNA 51
4.4. Reakcja amplifikacji DNA 52
4.5. Oczyszczanie produktów reakcji amplifikacji PCR 53
4.6. Trawienie restrykcyjne 54
4.7. Elektroforeza agarozowa 54
4.8. Elucja DNA z żelu agarozowego 54
4.9. Precypitacja DNA 54
4.10. Ligacja 55
4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA 55
4.12. Sekwencjonowanie DNA 55

4.13. Transformacja komórek bakteryjnych 55
4.13.1. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* 55
4.13.2. Transformacja komórek kompetentnych *M. smegmatis* 56
4.14. Konstrukcja wektorów do homologicznej rekombinacji 56
4.15. Mutanty SCO 57
4.16. Mutanty DCO 57
4.17. Selekcja mutantów SCO i DCO. Potwierdzenie genotypu mutantów DCO 57
4.18. Hybrydyzacja typu Southern blot 59
4.19. Komplementacja mutantów typu DCO z wykorzystaniem wektorów integracyjnych 60
4.20. Ocena wzrostu szczepów *M. smegmatis* w podłożu płynnym z dodatkiem związków azotowych lub węglowych stanowiących jedyne źródło azotu lub węgla 61
4.21. Ocena wzrostu szczepów *M. smegmatis* w podłożu płynnym z dodatkiem związków węglowych stanowiących jedyne źródło węgla z etapem głodzenia wstępnego 62
4.22. Globalna analiza transkryptomu (RNA-seq) 63
4.22.1. Indukcja głodzenia węglowego 63
4.22.2. Indukcja głodu azotowego 63
4.22.3. Izolacja RNA z komórek *M. smegmatis* 64
4.22.4. Rybodeplecja - Usunięcie rRNA 65
4.22.5. Przygotowanie bibliotek do analizy RNA-seq 65
4.22.6. Sekwencjonowanie bibliotek 66
4.22.7. qRT-PCR 67
4.23. Konstrukcja wektora do nadekspresji rekombinowanego białka MtrA 69
4.24. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka MtrA 69
4.25. Wymiana buforu oraz zatężanie białka MtrA 70
4.26. Oznaczanie stężenia białek 70
4.27. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących 70
4.28. EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay) 71
4.29. Analiza wrażliwości szczepów M. smegmatis na wybrane antybiotyki metodą Microplate Alamar Blue Assay 71
4.30. Analiza statystyczna 72
5. Wyniki 73
5.1. Znaczenie białek systemu dwukomponentowego MnoS-MnoR dla wzrostu komórek *M. smegmatis* 73
5.1.1. Konstrukcja ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_6236/msmeg_6238* 73

5.1.2 Ocena znaczenia obecności funkcjonalnych genów msmeg_6236, msmeg_6238 dla wzrostu komórek M. smegmatis 77

5.2. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem alkoholi jako jedynych źródeł węgla 78

5.3. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem węglowodanów 83

5.4. Analiza wrażliwości szczepów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_6236* i *msmeg_6238* na wybrane antybiotyki 85

5.5. Globalna analiza transkryptomiczna mutantów Δ*msmeg_6236* i Δ*msmeg_6238* 87

5.6. Analiza ścieżek metabolicznych indukowanych w szczepie dzikim mc^2 155 i szczepie delecyjnym Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) poddanych analizie RNA-seq w warunkach głodu węglowego oraz nielimitowanego dostępu glukozy 94

5.7. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu Sauton z dodatkiem różnych źródeł azotu 123

5.8. Ocena potencjalnej roli regulatora MtrA w metabolizmie azotu u *M. smegmatis* 127

5.9. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem związków azotowych 129

5.10. Globalna analiza transkryptomiczna mutanta Δ*mtrA* 137

6. Dyskusja 155

7. Wnioski 163

Streszczenie 164

Summary 167

Bibliografia 170

Wykaz skrótów

Zastosowany skrót	Znaczenie
Ack	octan potasu
AcP	fosforan acetylu
Amp^R	oporność na ampicylinę
APS	nadsiarczan amonu
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
ATP-aza	adenozynotrifosfataza
BSA	albumina surowicy bydlęcej
cAMP	cykliczny adenozyno-3`,5`-monofosforan
CCM	centralny metabolizm węgla
c-di-GMP	cykliczny monofosforan diguanozyny
cDNA	komplementarny DNA (ang. *complementary DNA*)
CFU	liczba jednostek tworzących kolonie (ang. *colony forming unit*)
cGMP	cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan
Ct	cykle progowe (ang. *copy treshold*)
Da (kDa)	Dalton (1000 Da)
DCO	podwójny krzyżowy rekombinant (ang. *double cross over recombinant*)
DEPC	pirowęglan dietylu
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
dNTP	mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	sól sodowa kwasu etyleno-diamino-tetraoctowego
EMSA	test zmiany ruchliwości elektroforetycznej (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
g	siła grawitacyjna
GAF	domena białka, jej nazwa pochodzi od cyklicznej fosfodiesterazy specyficzna dla GMP [cGMP], cyklazy adenylowej i białek FhlA
His	sześć histydyn
Hyg^R	oporność na higromycynę

IPTG	izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd
Km^R	oporność na kanamycynę
LB	podłoże Luria-Bertani
MABA	mikropłytkowy test przeżywalności komórek
MIC	minimalne stężenie związku hamujące wzrost drobnoustrojów
MNO	dehydrogenaza metanolowa
NDMA	N, N-dimetylo-p-nitrozoanilina
OADC	kwas oleinowy/albumina/dekstroza/katalaza
OD_{600}	gęstość optyczna zawiesiny komórek bateryjnych wyznaczana z wykorzystaniem fali o długości λ=600 nm (ang. *optical density*)
PAN	Polska Akademia Nauk
PCR	reakcja łańcuchowej polimeryzacji (ang. *polymerase chain reaction*)
PPP	szlak pentozofosforanowy
pz	liczba par zasad
qRT- PCR	ilościowy PCR z odwrotną transkryptazą
RNA	kwas rybonukleinowy(ang. *ribonucleic acid*)
RNASeq	metoda sekwencjonowania RNA
RNaza	rybonukleaza
SCO	pojedynczy krzyżowy rekombinant (ang. *single cross over recombinant*)
SDS	dodecylo siarczan sodu
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
TCA	cykl kwasu trikaroboksylowego
TCSs	dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (ang. *Two Component Transduction Systems*)
TEMED	N,N,N′,N′;-tetrametyloetylenodiamina
THP-1	ludzka linia monocytów różnicująca się do makrofagów klasy M1 i M2
UV	promieniowanie ultrafioletowe
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-galaktopiranozyd

1. Wstęp

1.1. Ogólna charakterystyka rodzaju *Mycobacterium*

Rodzaj *Mycobacterium* (prątki), należący do rodziny *Mycobacteriaceae*, rzędu *Actinomycetales* i klasy *Schizomycetes* obejmuje szeroki zakres ponad 190 gatunków (Meehan i wsp., 2021).

Bakterie należące do rodzaju *Mycobacterium* możemy podzielić obecnie na trzy podstawowe grupy. Pierwszą z nich stanowią gatunki należące do *Mycobacterium tuberculosis* complex. Są to prątki zdolne do wywołania gruźlicy zarówno u ludzi jak i u zwierząt, do których zaliczamy m.in. *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) – główny czynnik etiologiczny gruźlicy u ludzi, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) – prątek bydlęcy czy *Mycobacterium microti* (Bañuls i wsp., 2015). Do grupy drugiej, określanej mianem prątków niegruźliczych bądź atypowych, wywołujących mykobakteriozy należą m.in. *Mycobacterium avium* complex (*Mycobacterium avium* oraz *Mycobacterium intracellulare*), *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) czy *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) (Sharma i Upadhyay, 2020). Do trzeciej grypy zaliczamy prątki wywołujące trąd – *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) (Chavarro-Portillo i wsp., 2019).

Prątki przynależą do grupy bakterii gramododatnich, tlenowych, nieprzetrwalnikujących. Bakterie te nie wykazują zdolności poruszania się, nie posiadają wici i rzęsek. Unikatową cechą, wyróżniającą je spośród pozostałych rodzajów bakterii jest specyficzna budowa otoczki i ściany komórkowej. W skład ściany prątków wchodzą m.in. peptydoglikan, arabinogalaktan i kwasy mikolowe, których obecność warunkuje ich kwasooporność oraz stanowi swoistą barierę dla wielu związków, w tym środków dezynfekcyjnych czy leków (Alderwick i wsp., 2015; Kalscheuer i wsp., 2019; Kanabalan i wsp., 2021).

Mykobakterie stanowią grupę mikroorganizmów o zróżnicowanej morfologii. Do grupy tej zaliczamy bakterie o kształcie prostych lub lekko zakrzywionych pałeczek, o szerokości 0,2 – 0,6 µm i długości 1,0 – 10 µm. W zależności od gatunku rosną one w formie szorstkich lub gładkich kolonii o zróżnicowanych barwach, od białych po pomarańczowo-różowe (Percival i Williams, 2014).

W oparciu o cechy fenotypowe i filogenetyczne, dokonuje się licznych podziałów mykobakterii. Jeden z tych podziałów dotyczy tempa ich wzrostu. Na tej podstawie wyróżniono prątki szybko i wolno rosnące. Do grupy prątków wolno rosnących, czyli

zdolnych do wytworzenia kolonii na podłożu stałym i w optymalnych warunkach temperaturowych w czasie dłuższym niż 7 dni zaliczamy m.in. *M. tuberculosis*. Z kolei przedstawicielami prątków szybko rosnących, wykazujących zdolność do tworzenia kolonii w czasie krótszym niż 7 dni są *M. abscessus* oraz *Mycolicibacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) (Kim i wsp., 2013; Bachmann i wsp., 2020).

Kolejny podział mykobakterii dotyczy jest zdolności do wytwarzania pigmentów z grupy karotenoidów. Biorąc pod uwagę powyższe kryterium możemy je podzielić na: prątki niefotochromagenne czyli takie, które nie wykazują zdolności do produkcji barwników (*M. avium*, *Mycobacterium xenopi*), fotochromogenne – zdolne do wytwarzania barwnika w obecności światła (*Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium simiae*) oraz prątki skotochromogenne, łączące w sobie właściwości do wytwarzania barwników zarówno w ciemności jak i pod wpływem światła (*Mycobacterium paragordonae*,*Mycobacterium scrofulaceum)* (Percival i Williams, 2014; Forbes, 2017; Sharma i Upadhyay, 2020).

1.2. Ogólna charakterystyka rodzaju *Mycolicibacterium*

Rodzaj *Mycolicibacterium* należący do rodziny *Mycobacteriaceae*, rzędu *Actinomycetales* i klasy *Schizomycetes* obejmuje prątki szybkorosnące, niefotochromogenne, w większości saprofityczne, posiadające genom wielkości od 3 100 000 do 10 500 000 par zasad (Gupta i wsp., 2018Według bazy danych LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclatur, https://lpsn.dsmz.de/) obecnie, do tego rodzaju zaliczamy 99 gatunków, wśród których znajduje się m.in. *M. smegmatis*, gatunek saprofityczny, szybkorosnący, stanowiący główny model badawczy, wykorzystany w przygotowaniu niniejszej pracy.

Przeprowadzone analizy porównawcze *M. smegmatis* w odniesieniu do *M. tuberculosis* wskazują na różnice w budowie zarówno całych komórek, jak i ich poszczególnych komponentów. Różnice te obejmują: objętość cytoplazmy, gęstość rybosomów, liczbę rybosomów, wykazując wyższe wartości w komórkach *M. smegmatis*. Ponadto, zaobserwowano różnice dotyczce kwasooporności. W przypadku barwienia metodą Ziehl-Neelsena, u *M. smegmatis*, w przeciwieństwie do *M. tuberculosis* dochodzi do utraty kwasooporności. Zaobserwowana różnica może wynikać z faktu, iż ściana

komórkowa prątków *M. smegmatis* ma niższą zawartość węgla i krótsze łańcuchy kwasów mikolowych, niż te wchodzące w skład ściany komórkowej *M. tuberculosis* (Gupta i wsp., 2018; Yamada i wsp., 2018; Dahl i wsp., 2019).

1.3. Gruźlica na świecie

Gruźlica, której czynnikiem etiologicznym jest *M. tuberculosis*, jest najgroźniejszą bakteryjną chorobą zakaźną. Pomimo znacznych postępów odnotowanych w diagnostyce i leczeniu gruźlicy na przestrzeni ostatnich lat, choroba ta, ciągle stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia i życia milionów ludzi na całym świecie (Chakaya i wsp., 2022). Według ostatniego raportu WHO (ang. *World Health Organization*) opublikowanego w 2022 r. na gruźlicę zachorowało około 10,6 miliona osób, czyli o 4,5% więcej niż w 2020 r. Szacunkowa liczba zgonów z powodu gruźlicy wyniosła około 1,6 miliona osób (wśród osób HIV-negatywnych i HIV-pozytywnych), przekraczając poziom liczby zgonów w latach 2019-2020 (Global tuberculosis report 2022).

Gruźlica wywołana przez szczepy wrażliwe na leki jest chorobą w pełni uleczalną choć terapia jest procesem długotrwałym (6 miesięcy) i wymagającym od pacjenta codziennego przyjmowania koktajlu czterech leków (rifampicyny, izoniazydu, etambutolu i pyrazynamidu) przez okres dwóch miesięcy oraz dwóch leków (streptomycyny i kanamycyny) przez kolejne 4 miesiące. Czas trwania terapii oraz skutki uboczne leków powodują częste przypadki czasowego lub całkowitego zaniechania procesu leczenia co może prowadzić nie tylko do braku skutecznej eradykacji prątków z organizmu danego pacjenta ale także do selekcji szczepów opornych na leki. Gruźlica wielolekooporna (ang. *multi-drug resistant*, MDR TB), która stanowi rosnący problem w epidemiologii wywołana jest przez bakterie oporne na co najmniej dwa najsilniejsze leki przeciwgruźlicze rifampicynę i izoniazyd. Gruźlica o rozszerzonej oporności (ang. *extensivly drug resistant*, XDR TB) wywołana jest przez szczepy MDR oporne dodatkowo na fluorochinolony i bedakilinę lub linezolid. Rosnąca liczba szczepów wielolekoopornych, długotrwałe leczenie trwające do dwóch lat z zastosowaniem kombinacji kilku leków wykazujących poważne skutki uboczne, wymaga wprowadzenia zarówno nowych strategii terapeutycznych jak i poszukiwania nowych leków, które umożliwią skuteczną walkę z wielolekoopornymi prątkami gruźlicy (Santucci i wsp., 2021; Bhandari i wsp., 2022). Dodatkowo, negatywny wpływ zarówno na leczenie, jak i diagnostykę gruźlicy wywarła

pandemia COVID-19. Sytuacja ta wymaga reorganizacji podjętych planów leczenia gruźlicy zarówno w skali krajowej jak i globalnej.

1.4. Infekcja *M. tuberculosis*

Prątek gruźlicy jest wewnątrzkomórkowym patogenem, a jego cykl życiowy uzależniony jest od namnażania i przeżycia w komórkach gospodarza. Gruźlica jest chorobą, która prowadzi do licznych zmian ogólnoustrojowych wynikających z interakcji zachodzących pomiędzy patogenem, a układem odpornościowym gospodarza (Shariq i wsp., 2023). Do zakażenia dochodzi przez przedostanie się patogenów do pęcherzyków płucnych poprzez drogi oddechowe, błony śluzowe, uszkodzone warstwy skóry czy układ pokarmowy, na skutek kontaktu z osobą z czynną postacią gruźlicy. W przebiegu aktywnego zakażenia gruźlicą możemy wyróżnić kilka głównych etapów: aerozolizację, fagocytozę, hamowanie dojrzewania fagosomu, odpowiedź Th1 (pomocniczą), wytworzenie ziarniniaków, wystąpienie objawów klinicznych i rozwój aktywnej postaci choroby z możliwością jej przenoszenia (Bussi i Gutierrez, 2019; Maison, 2022). Zachodzące zmiany chorobowe dotyczą głównie układu oddechowego, obejmując płuca, ale mogą również rozprzestrzenić się na skórę, układ nerwowy, węzły chłonne, stawy i kości czy układ moczowo-płciowy (Rahlwes i wsp., 2022).

Oprócz aktywnej postaci gruźlicy wyróżniamy również formę utajoną. Osoby, u których występuje postać utajona nie przejawiają żadnych objawów chorobowych, nie zakażają i stanowią około 25% światowej populacji. Fundamentalne znaczenie w ograniczeniu i wyeliminowaniu rozprzestrzeniania się gruźlicy w skali globalnej ma szybka i skuteczna diagnostyka osób z formą aktywną i utajoną choroby (Fehily i wsp., 2022; Kestler i Tyler, 2022).

1.5. Adaptacje bakterii do środowiska

Bakterie zasiedlając różnorodne nisze ekologiczne wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających im adaptację do zmieniających się warunków środowiska, zarówno wewnątrz zakażonego organizmu jak i podczas transmisji. Do mechanizmów obronnych, wykształconych przez bakterie narażone na działanie czynników stresowych o podłożu fizycznym, chemicznym lub biologicznym zalicza się zarówno tymczasowe jak i trwałe

modyfikacje. Modyfikacje tymczasowe zachodzą pod wpływem zmian ekspresji genów związanych ze zmianami fenotypowymi o charakterze krótkoterminowym. Ewolucja adaptacyjna dotyczy natomiast nabycia przez bakterie korzystnych mutacji, warunkujących ich przetrwanie w nowych warunkach środowiska na skutek działania silnej i trwałej selekcji (Shi i wsp., 2022).

1.5.1. Mechanizmy adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska

Zarówno bakterie gramododatnie jak i gramoujemne na skutek działania czynników biotycznych i abiotycznych wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających im dostosowanie się do zmiennych warunków. Do mechanizmów tych zaliczamy m.in. zmianę morfologii komórek z normalnej, charakterystycznej dla danej grupy bakterii na formę nitkowatą (Khan i wsp., 2022), wykształcenie strategii „ang. bet-hedging" wpływającej na tworzenie się form przetrwalnikujących (Morawska i wsp., 2022), wykształcenie plazmidów niosących geny oporności na antybiotyki (Billane i wsp., 2022; Maslova i wsp., 2022), wytwarzanie peptydów przeciwbakteryjnych, które doprowadzają do eliminacji gatunków blisko spokrewnionych (Ghilarov i wsp., 2021), czy produkcję biopolimerów magazynujących m.in. polihydroksymaślan (Müller-Santos i wsp., 2021).

Wykształcenie mechanizmów umożliwiających przystosowanie się do zmieniających warunków środowiska jest szczególnie istotne w przypadku mykobakterii, które zasiedlają różnorodne środowiska bytowe.

W przypadku *M. tuberculosis* kluczową rolę odgrywa zdolność patogenu do przystosowania się do warunków panujących w różnych fazach infekcji gospodarza oraz wykształcenie mechanizmów umożliwiających kontrolę nad jego układem odpornościowym, co warunkuje przeżycie w organizmie gospodarza (Bonds i Sampson, 2018). Dodatkową cechą umożliwiającą prątkom gruźlicy przetrwanie w organizmie człowieka jest aktywacja mechanizmu umożliwiającego przejście w stan latencji, charakteryzujący się zmianami w obrębie osłon komórkowych, obniżonym poziomem metabolizmu, i silnie ograniczonymi podziałami komórkowymi (Getahun i wsp., 2015).

1.6. Regulacja ekspresji genów

Regulacja ekspresji genów jest jednym z mechanizmów wpływających na zdolność adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska. Istnienie zróżnicowanych procesów regulacyjnych umożliwia bakteriom szybką i ukierunkowaną zmianę profilu transkrypcyjnego, co w wielu przypadkach jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania bądź przeżycia w niekorzystnych warunkach. Ekspresja genów będąca złożonym, wieloetapowym procesem pozwala na odczytanie informacji genetycznej, a każdy z jej etapów może podlegać dodatkowym regulacjom. Efektem tych zmian na poziomie transkrypcji i translacji jest wyciszenie lub aktywacja ekspresji określonych genów oraz biosynteza wyspecjalizowanych protein, co w efekcie umożliwia regulację metabolizmu komórkowego (Bian i wsp., 2022; Jaworska i wsp., 2022).

Zdolność do zmiany profilu transkrypcyjnego opiera się na złożonych sieciach regulacyjnych, na które wpływ mają m.in. czynniki sigma, czynniki transkrypcyjne pełniące rolę represorów lub aktywatorów transkrypcji, globalne regulatory transkrypcji jak również dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (ang. *two component transduction systems* (TCSs) (Miotto i wsp., 2022).

1.6.1. Czynniki sigma

Czynniki sigma (σ) odgrywające kluczową rolę w inicjacji transkrypcji są małymi, wymiennymi podjednostkami, które po połączeniu z polimerazą RNA tworzą kompleks, tzw. holoenzym (Opęchowska i Bielecki, 2014). Jako kluczowe elementy regulacyjne czynniki σ są częstym celem manipulacji genetycznych mających na celu zwiększenie tolerancji bakterii na warunki stresowe (Srivastava i wsp., 2020). Czynniki sigma występują u wszystkich bakterii, przykładowo *M. tuberculosis* koduje 13 czynników sigma, z czego jeden – σ^A jest niezbędny do przeżycia prątka. Pozostałe 12 czynników jest aktywowanych w odpowiedzi na specyficzne sygnały środowiskowe. Do ich aktywacji dochodzi na skutek różnych bodźców takich jak stres oksydacyjny, stres alkaliczny, obniżenie pH, niedotlenienie czy niedobór składników odżywczych. Wykazano, iż spośród czynników sigma występujących u *M. tuberculosis* co najmniej pięć jest zaangażowanych w interakcje z lekami i bierze udział w nabywaniu lekooporności (Chen i wsp., 2021; Miotto i wsp., 2022).

1.6.2. Czynniki transkrypcyjne

Czynniki transkrypcyjne indukujące proces transkrypcji tworzą odrębną klasę białek i wykazują zdolność do oddziaływania bezpośrednio z polimerazą bądź generowanym transkryptem rozpoznając określone sekwencje DNA. Oddziaływanie to ma na celu aktywację lub hamowanie transkrypcji określonych genów, w odpowiedzi na sygnały docierające ze środowiska zewnętrznego komórki (Lai i wsp., 2019). U podstaw tych odkryć leżało wyodrębnienie modelu operonu, który obejmuje grupę funkcjonalnie powiązanych genów bakteryjnych podlegających wspólnej transkrypcji i regulacji. Udowodniono ponadto, iż na regulację jednego operonu może wywierać wpływ kilka różnych czynników transkrypcyjnych. Geny współtworzące operon mają wspólny promotor, który generuje jeden transkrypt (Busby, 2019).

1.7. Metabolizm azotu i węgla

Metabolizm azotu i węgla jest współzależny u wszystkich organizmów. Przykładowo, cykl kwasu trikaroboksylowego (TCA), glikoliza i szlak pentozofosforanowy (PPP), które oparte są na przemianach węgla, prowadzą do syntetyzy aminokwasów i nukleotydów. Określenie zależności występujących w metabolizmie azotu i węgla, jest szczególnie istotne w przypadku bakterii patogennych, takich jak *M. tuberculosis* (Borah Slater i wsp., 2023).

1.7.1. Metabolizm azotu u mykobakterii

Azot jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu bakterii oraz ważnym składnikiem makrocząsteczek biologicznych. W związku z tym, odpowiedź komórki w warunkach ograniczonego dostępu azotu ma kluczowe znaczenie dla przeżycia bakterii i obejmuje wzajemne oddziaływanie szlaków sygnałowych i regulację transkrypcji genów zaangażowanych w metabolizm azotu (Jenkins i wsp., 2013). Aby uzyskać dostęp do azotu, w postaci innych, alternatywnych źródeł m.in. amoniaku, azotanów, azotynów, różnych aminokwasów czy organicznych związków azotowych, bakterie wykształciły szereg mechanizmów optymalizujących ich adaptację do przeżycia w warunkach głodu azotowego (Yao i wsp., 2014, Shi i wsp., 2023).

Regulacja metabolizmu azotu odbywa się na dwóch poziomach. Jednym z nich jest regulacja transkrypcji genów zaangażowanych w metabolizm azotu, drugim zaś, potranslacyjna kontrola aktywności metabolicznej w szlaku asymilacji azotu (Han i wsp., 2022).

Preferowanymi przez bakterie źródłami azotu są amon (NH_4^+) oraz amoniak (NH_3), które pozwalają bakteriom na utrzymanie wysokiego tempa wzrostu w porównaniu z innymi źródłami azotu. Obydwa związki są włączane do glutaminianu i glutaminy na drodze dwóch, różnych mechanizmów asymilacji z wykorzystaniem dehydrogenazy glutaminianowej lub syntetazy glutaminy/syntetazy glutaminianowej, co w efekcie pozwala na wykorzystanie azotu w wewnątrzkomórkowych procesach metabolicznych zachodzących w komórkach bakteryjnych. Ponadto udowodniono, iż wiele bakterii może transportować i metabolizować alternatywne źródła azotu w postaci azotynów, azotanów, peptydów, aminokwasów czy nukleotydów, które ulegają przekształceniu w amon, co jest kluczowe w sytuacji, gdy w środowisku komórki dochodzi do wyczerpania się podstawowych źródeł azotu. (Petridis i wsp., 2015).

Transport amonu przez błonę komórkową odbywa się z udziałem białek transbłonowych należących do rodziny Amt/Mep. *M. smegmatis* koduje trzy paralogi genu tj. *amtA* (*msmeg_4635*), *amtB* (*msmeg_2425*) i *amt1* (*msmeg_6259*), podczas gdy *M. tuberculosis* koduje tylko jeden homolog *amtB* (*rv2920c*). Dodatkowo, w transport związków azotowych u *M. tuberculosis* zaangażowane są NarK, regulujący transport aminokwasów oraz transportery ABC odpowiedzialne za transport aminokwasów (Xu i wsp., 2022). Regulacja transkrypcyjna różnych transporterów amonu u promieniowców jest kontrolowana przez dwa regulatory metabolizmu azotu – GlnR i AmtR (Petridis i wsp., 2015). Z kolei u *M. tuberculosis* centralnymi białkami regulatorowymi metabolizmu azotu są GlnE, GlnB/GlnK, GlnD oraz GlnR (Xu i wsp., 2022).

W odpowiedź prątków *M. smegmatis* na warunki związane z niedoborem azotu zaangażowane jest około 400 genów o różnej ekspresji, oraz około 30 regulatorów transkrypcji, jak również kilka, niekodujących RNA (Petridis i wsp., 2015). Z kolei kluczowe badania związane z metabolizmem azotu u *M. tuberculosis* pokazały, iż ważną rolę w przeżyciu prątków w komórkach makrofagów gospodarza podczas infekcji pełnią dwa aminokwasy – L-asparaginian i L-asparagina. Oprócz nich, prątki gruźlicy podczas wzrostu wewnątrzkomórkowego są w stanie wykorzystywać glutaminian, glutaminę, walinę,

leucynę, alaninę i glicynę. Dodatkowo wykazano iż *M. tuberculosis* w warunkach *in vitro* może współmetabolizować dwa aminokwasy jednocześnie (Borah i wsp., 2019; Agapova i wsp., 2019).

1.7.2. Metabolizm węgla u mykobakterii

Prątek gruźlicy posiada zdolność do współmetabolizowania wielu substratów węglowych wewnątrz komórek gospodarza, a centralny metabolizm węgla (*ang. central carbon metabolism* (CCM)) u tych bakterii odgrywa kluczową rolę w ich fizjologii i patogenności. Liczne badania potwierdziły obecność w komórkach *M. tuberculosis* enzymów szlaków CMM w tym cyklu kwasu trikarboksylowego, glikolizy, szlaku pentozofosforanowego oraz ich zdolność do wykorzystywania szeregu glikolitycznych substratów węglowych, w tym cukrów i triglicerydów takich jak glukoza, mannoza, trehaloza czy pirogronian (Xu i wsp., 2022). Szereg badań wskazują, iż do rozwinięcia plastyczności metabolicznej u *M. tuberculosis* doszło na skutek działania stresu oksydacyjnego i azotowego ze strony ludzkiego układu odpornościowego, co doprowadziło do nabycia przez CCM dwóch, równorzędnych funkcji: fizjologicznej i patogennej (Cumming i Steyn, 2015). Cykl TCA generuje substraty do fosforylacji oksydacyjnej, produkcji energii oraz dostarcza biosyntetyczne prekursory aminokwasów i lipidów. *M. tuberculosis* rozkłada kwasy tłuszczowe za pomocą szlaków β-oksydacji, a pochodne prekursorów, takie jak acetylo-CoA, są wykorzystywane do napędzania centralnego metabolizmu i biosyntezy lipidów. W tym celu wykorzystuje kwasy tłuszczowe i cholesterol pochodzące z komórek odpornościowych gospodarza (Xu i wsp., 2022). *M. tuberculosis* wykorzystuje również dwa, alternatywne szlaki (cykl cytrynianu metylu i szlak metylomalonylowy zależny od witaminy B12) do metabolizowania propionylo-CoA pochodzącego z metabolizmu steroli, kwasów tłuszczowych o nieparzystych łańcuchach rozgałęzionych i aminokwasów (Eoh i Rhee, 2014, Borah i wsp., 2021).

Mechanizmem niezbędnym do przeżycia prątków w komórkach gospodarza jest proces glukoneogenezy. Udowodniono, iż inaktywacja tego procesu prowadzi do zahamowania procesu infekcji, na skutek czego komórki prątków są eliminowane z organizmu gospodarza. Do zahamowanie wzrostu prątków *M. tuberculosis* dochodzi również na skutek zablokowania szlaku fosforylacji oksydacyjnej. Dzieje się tak z powodu

braku zdolności prątków do przeprowadzania fermentacji co jest ściśle związane z brakiem dehydorgenazy mleczanowej (Kalia i wsp., 2019).

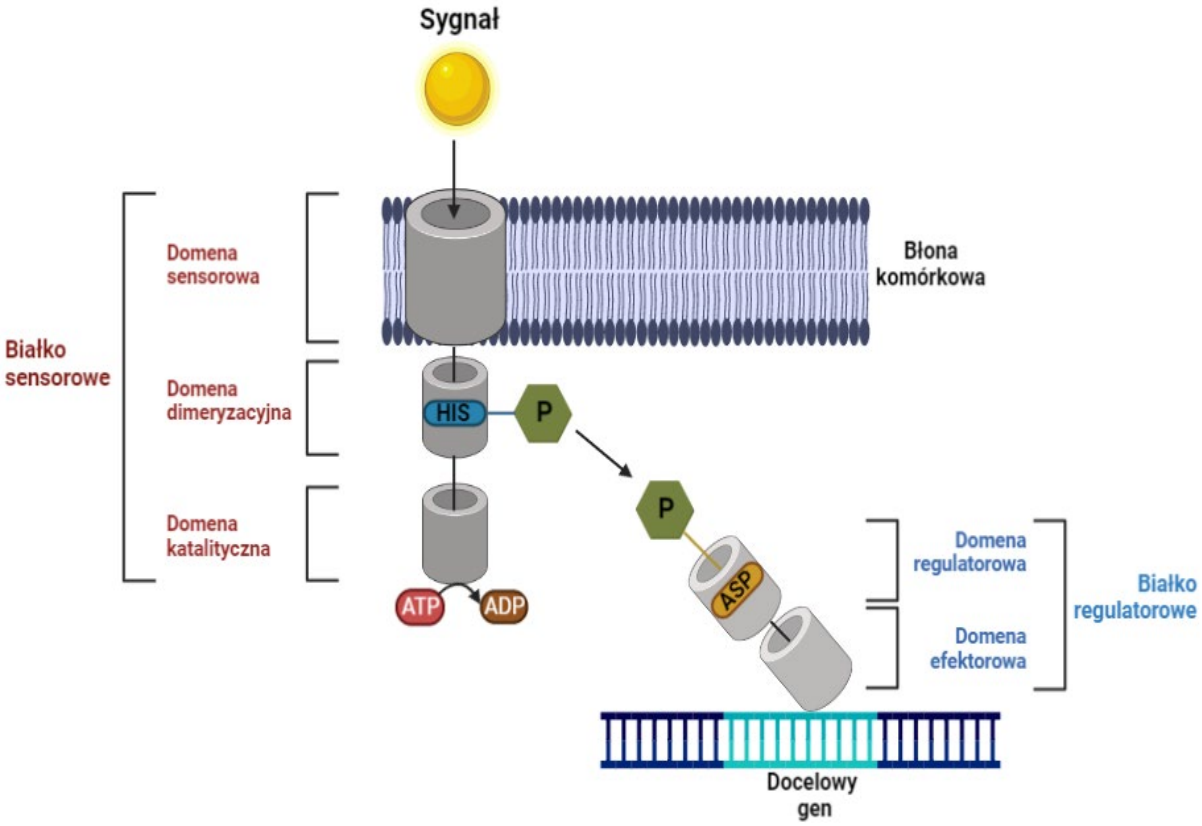
1.8. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału jako czynniki adaptacyjne do zmieniających się warunków środowiska

Jednymi z powszechnie występujących mechanizmów umożliwiających organizmom adaptację do zmieniających się warunków środowiska są dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału wpływające na ekspresję określonych genów. Systemy te występują powszechnie u bakterii, są obecne również u archeonów i u niektórych organizmów eukariotycznych takich jak drożdże czy grzyby. (Zschiedrich i wsp., 2016; Hirakawa i wsp., 2020).

Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału zaangażowane są w kontrolę licznych procesów zachodzących u bakterii, do których zaliczamy: regulację szlaków metabolicznych, tworzenie biofilmu, wykształcenie mechanizmów wirulencji, transport jonów i substancji odżywczych, syntezę antybiotyków czy kontrolę replikacji (Xie i wsp., 2022). Systemy te umożliwiają drobnoustrojom adaptację do środowiska, w którym czynnikami zmiennym mogą być: temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne, stężenie jonów metali, stężenie związków odżywczych jak również stres oksydacyjno-redukcyjny (Kohanski i wsp., 2008; van Hoek i wsp., 2019; Gu i wsp., 2021).

Liczba TCSs występujących u bakterii jest zróżnicowana. Analiza genomów różnych gatunków bakterii wykazała, iż mikroorganizmy te mają średnio 52 TCSs, chociaż niektóre z genomów zawierają ponad 200 genów związanych z TCSs (Krell i wsp., 2010; Butcher i Tabor, 2022). Wpływ na liczbę TCSs w danym gatunku bakterii ma m.in. środowisko bytowania drobnoustrojów. Bakterie zasiedlające zróżnicowane środowiska kodują więcej TCSs niż mikroorganizmy żyjące w środowiskach jednorodnych. Białka systemu dwukomponentowego mogą być transkrybowane niezależnie lub kodowane we wspólnym dla danej pary operonie (Cook i Whitworth, 2007; Groisman, 2016).

W budowie TCSs, występujących u większości bakterii możemy wyróżnić dwa, podstawowe komponenty: białko sensorowe tj. kinazę histydynową (HK) oraz jego docelowe białko regulatorowe (RR) czyli (**Rycina 1.**) (Krell i wsp., 2010; Wolanin i wsp., 2002).



Rycina 1. Schemat budowy dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału (zmodyfikowano z: West i Stock, 2001; schemat wykonany w programie BioRender.com).

1.8.1. Kinaza histydynowa

Kinaza histydynowa, poprzez wykrywanie zmian środowiskowych przekazuje informacje do wnętrza komórki. HK to zazwyczaj białka transbłonowe, jednak spotyka się je również w przestrzeni peryplazmatycznej, cytoplazmie czy w błonie cytoplazmatycznej. HK odgrywają kluczową rolę w procesach sygnalizacyjnych zachodzących w komórkach bakteryjnych poprzez kompleksowe działanie związane z odbiorem określonych bodźców, przekazaniem sygnału przez błonę cytoplazmatyczną, przeprowadzeniem autofosforylacji oraz transfosforylacji, a w przypadku niektórych HK również defosforylacji pokrewnego regulatora odpowiedzi (Raczkowska i wsp., 2020; Alvarez i Georgellis, 2022).

W budowie HK wyróżniamy trzy domeny: N-końcową domenę sensoryczną oraz C-końcową domenę dimeryzacyjną i katalityczną (Kinoshita-Kikuta i wsp., 2022). Domena dimeryzacyjna i katalityczna działają jak dimery, w których jeden monomer katalizuje fosforylację reszt histydyny w drugim monomerze (Parish, 2014).

W obecności bodźca tj. czynnika indukującego pochodzenia fizycznego lub chemicznego, dochodzi do aktywacji kinazy poprzez wiązanie ATP, co w efekcie prowadzi

do autofosforylacji konserwatywnej reszty histydyny wchodzącej w skład domeny dimeryzacyjnej. Obie domeny, dimeryzacyjna i katalityczna stanowią miejsca integracji z RR, odpowiadając za specyficzność tych reakcji (Wolanin i wsp., 2002; Krell i wsp., 2010; Parish, 2014).

Oprócz klasycznych wersji HK, których działanie oparte jest na dwuetapowym mechanizmie fosforyzacyjnym, występują również czterostopniowe mechanizmy w niekonwencjonalnych oraz hybrydowych wersjach kinaz (Liu i wsp., 2019).

1.8.2. Białko regulatorowe

Białka regulatorowe to cytoplazmatyczne peptydy, które poprzez odbiór informacji przekazanej na drodze fosforylacji przez kinazę histydynową wpływają na zmianę profilu ekspresji genów niezbędnych do skutecznej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Większość RR, szczególnie te występujące w ludzkich patogenach, to białka wiążące DNA, których fosfo-aktywacja przekłada się na zmieniony stan transkrypcji komórki bakteryjnej i późniejsze odpowiedzi fenotypowe (Parish, 2014; Stupar i wsp., 2022). W budowie RR wyróżniamy dwie domeny: konserwatywną ewolucyjnie N-końcową domenę regulatorową oraz C-końcową domenę efektorową, charakteryzującą się dużą zmiennością budowy u różnych gatunków bakterii (Raczkowska i wsp., 2020).

Na skutek fosforylacji reszty asparaginowej poprzez reakcje katalizowane przez domenę katalityczną HK dochodzi do zmiany konformacji domeny regulatorowej, co skutkuje uwidocznieniem ulokowanego na domenie efektorowej motywu wiązania DNA (Raczkowska i wsp., 2020). Domena efektorowa wykazuje zdolność do wiązania się z regionami promotorowymi DNA, wywołując zmianę w ekspresji docelowego genu, jak i dodatkowo lub alternatywnie może modyfikować aktywność biochemiczną docelowych białek (Groisman, 2016; Ibrahim i wsp., 2016; Raczkowska i wsp., 2020).

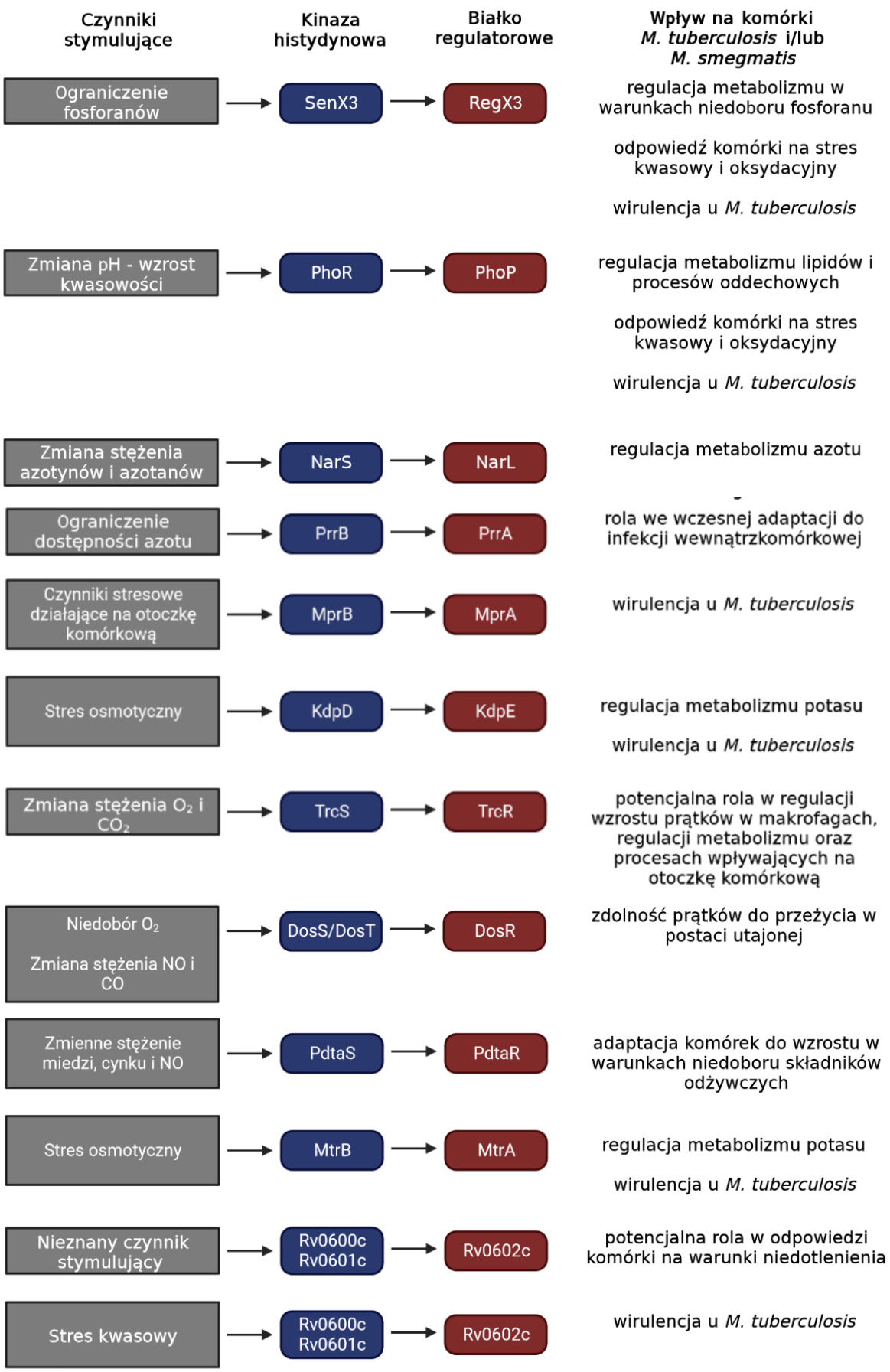
1.8.3. TCSs u różnych gatunków bakterii

Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału są szeroko rozpowszechnione wśród licznych grup organizmów, których podstawową funkcją jest dostosowanie odpowiedzi komórki na zmieniające się warunki środowiska. Niektóre TCSs odpowiadają za zmiany zachodzące w komórkach związane z ekspozycją na działanie antybiotyków czy warunków panujących wewnątrz organizmów żywicieli (Tierney i Rather, 2019).

Przykładowo, ludzki patogen bakteryjny, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), koduje 16 TCSs, a szczepy oporne na metycylinę (MRSA, ang. *methicyllin-resistant Staphylococcus aureus*), kodują jeden dodatkowy TCS. Spośród wszystkich kodowanych systemów, tylko jeden WalR/WalK jest niezbędny to utrzymania funkcji życiowych tych patogenów, a wchodzące w jego skład białko sensoryczne wiąże się z domeną cytoplazmatyczną w celu zahamowania autofosforylacji (Tiwari i wsp., 2017; Bleul i wsp., 2022). Dwuskładnikowy system PhoP/PhoQ, występujący w komórkach *Salmonella* spp., w tym u *Salmonella enterica* jest głównym i niezbędnym regulatorem wirulencji tych szczepów, w którym RR hamuje tworzenie kompleksu PhoP-DNA (Tiwari i wsp., 2017; Cabezudo i wsp., 2022). System TorR/TorS reguluje ekspresję genów kwasooporności w komórkach *Escherichia coli*, zwiększając ich zdolność do przetrwania w silnie zakwaszonym środowisku układu pokarmowego żywiciela, ułatwiając im kolonizację i utrzymanie wysokiego stopnia patogenności (Li i wsp., 2022). Z kolei TCS- GacS/GacA- występujący u patogennego szczepu *Acinetobacter baumannii* kontroluje procesy związane m.in. z metabolizmem węgla, ruchliwością komórek czy zdolnością do wytwarzania biofilmu (Casella i wsp., 2023; Cerqueira i wsp., 2014).

1.8.4. Dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału u mykobakterii

W genomie *M. tuberculosis* potwierdzono występowanie 12 sparowanych systemów transdukcji sygnału **(Rycina 2.)**, 5 sierocych białek regulatorowych i 2 sierocych kinaz histydynowych. Systemy te odgrywają istotną rolę w regulacji wielu procesów zachodzących w komórkach *M. tuberculosis,* w tym w procesie patogenezy tych drobnoustrojów (Stupar i wsp., 2022).



Rycina 2. Charakterystyka TCSs występujących u mykobakterii.

1.8.4.1. SenX3-RegX3

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału SenX3-RegX3, w budowie którego wyróżniamy kinazę SenX3 oraz białko regulatorowe RegX3 u *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* reguluje ekspresję około 100 genów, wpływając m.in. na odpowiedź komórki w warunkach niedoboru fosforanu, degradację kwasów tłuszczowych, stres kwasowy i oksydacyjny (Xu i wsp., 2021; Mahatha i wsp., 2022). Ponadto, stwierdzono jego udział w tworzeniu pęcherzyków błonowych (White i wsp., 2018) oraz wpływ na wirulencję prątków gruźlicy, która w mutantach pozbawionych funkcjonalnego systemu SenX3-RegX3 ulega obniżeniu.

1.8.4.2. PhoP-PhoR

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PhoP-PhoR odgrywa znaczącą rolę w wirulencji *M. tuberculosis*, warunkując jego zjadliwość oraz bierze udział w utrzymaniu homeostazy oksydacyjnej w komórkach prątków. System ten składa się z transbłonowej kinazy histydynowej PhoR i regulatora odpowiedzi PhoP, który reguluje ekspresję ponad 150 genów (Xing i wsp., 2017; Feng i wsp., 2018). System ten wpływa na przeżywalność prątków w kwaśnym środowisku, reguluje metabolizm lipidów i oddychanie (Bretl i wsp., 2011; Bansal i wsp., 2017).

1.8.4.3. NarL-NarS

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału NarL-NarS odpowiadający za regulację metabolizmu azotanów składa się z kinazy histydynowej NarS oraz regulatora odpowiedzi NarL (Malhotra i wsp., 2015), który reguluje ekspresję około 30 genów oraz oddziałuje z DevR, będącym składnikiem innego TCS (Kundu, 2018).

1.8.4.4. PrrA-PrrB

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału PrrB-PrrA składa się z kinazy histydynowej PrrB i regulatora odpowiedzi PrrA wpływa na regulację genów w warunkach ograniczonego dostępu azotu, odgrywa rolę we wczesnej adaptacji prątków do infekcji,

reguluje odpowiedź komórki na skutek zmiany pH oraz stężenie jonów Cl^-. System ten, jest niezbędny do przeżycia komórek *M. tuberculosis* (Kundu, 2018; Giacalone i wsp., 2022).

1.8.8.5. MprA-MprB

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału MprA-MprB, w skład którego wchodzi kinaza histydynowa MprB i regulator odpowiedzi MprA bierze udział w reakcji komórek prątków na stres taki jak działania na komórki detergentów, zmiany pH na zasadowe, co prowadzi do nieprawidłowego fałdowania białek w przestrzeni peryplazmatycznej (Bretl i wsp., 2014Regulator odpowiedzi MprA reguluje ekspresję około 200 genów zaangażowanych m.in. w wirulencję, procesy oddechowe, metabolizm lipidów czy detoksyfikację (Stupar i wsp., 2022).

1.8.8.6. KdpD-KdpE

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału KdpD-KdpE, w budowie którego wyróżniamy kinazę KdpD oraz białko regulatorowe KdpE, występuje u *M. tuberculosis* i *M. smegmatis*, reguluje ekspresję genów na skutek działania czynników takich jak stres osmotyczny, stres kwasowy, stres odżywczy, stres temperaturowy, stężenie ATP, limitujące stężenie jonów K^+ czy zwiększone stężenie jonów Na^+ (Ali i wsp., 2017; Kundu, 2018). System KdpD-KdpE prowadzi do ograniczenia wzrostu prątków w obrębie makrofagów (Hamidieh i wsp., 2021).

1.8.8.7. TrcR-TrcS

Dwukomponentowy system transdukcji sygnału TrcR-TrcS, w skład którego wchodzi kinaza histydynowa TrcS i regulator odpowiedzi TrcR najprawdopodobniej ulega ekspresji we wczesnej fazie infekcji makrofagów oraz w warunkach obniżonej zawartości tlenu w środowisku (Haydel i Clark-Curtiss, 2006; Hamidieh i wsp., 2021). Najnowsze badania dotyczące systemu TrcR-TrcS wskazują, iż czynnikiem stymulującym regulację genów przez ten system jest najprawdopodobniej zmieniające się stężenie CO_2, co w efekcie może prowadzić do regulacji metabolizmu *M. tuberculosis* lub wpływać na funkcjonowanie procesów związanych z osłonami komórkowymi prątków (Dechow i wsp., 2022).

1.8.8.8. DosR-DosT (DosR-DosS)

W budowie dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału DosR-DosT wyróżniamy kinazę DosT współpracującą z kinazą DosS oraz regulator odpowiedzi DosR, którego aktywacja zachodzi w warunkach niedotlenienia, zmiennego stężenia tlenku azotu lub tlenku węgla. Regulator odpowiedzi DosR reguluje ekspresję około 50 genów, które są niezbędne do przeżycia prątków w fazie latencji (Kundu, 2018; Hamidieh i wsp., 2021).

1.8.8.9. PdtaR-PdtaS

W skład dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału PdtaR-PdtaS, wchodzi kinaza histydynowa PdtaS (Rv3220c) i regulator odpowiedzi PdtaR (Rv1626). System ten wpływa na wydajność oddychania oksydacyjnego i modyfikuje syntezę białek, co przyczynia się do zmian wrażliwości na antybiotyki aminoglikozydowe, których działanie opiera się na inaktywacji procesów zachodzących na rybosomach (Dadura i wsp., 2017). Niedawne badania naukowe wskazują na udział białka PdtaS w detekcji cyklicznego monofosforanu diguanozyny (c-di-GMP), poprzez jego wiązanie się z c-di-GMP w stężeniach submikromolarnych, następuje zaburzanie sygnalizacji dwuskładnikowego systemu PdtaS-PdtaR (Hariharan i wsp., 2021). Ponadto, udowodniono, iż inaktywacja genu *pdtaS* w komórkach *M. smegmatis* prowadzi do zahamowania wzrostu mutanta w pożywce z limitowaną zawartością aminokwasów (Hariharan i wsp., 2021).

1.8.8.10. Rv0600c – Rv0601c – Rv0602c

W budowie dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału Rv0600c-Rv0601c-Rv0602c, wyróżniamy dwie kinazy histydynowe: Rv0600c (HK1), Rv0601c (HK2) oraz regulator odpowiedzi Rv602c (TcrA). System ten występuje wyłącznie w komórkach *M. tuberculosis*, a do jego aktywacji dochodzi w warunkach niedoboru tlenu (Shrivastava i wsp., 2009; Stupar i wsp., 2022).

1.8.8.11. TcrX-TcrY

W skład dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału TcrX-TcrY, wchodzi kinaza histydynowa TcrY i regulator odpowiedzi TcrX. Przeprowadzone badania wskazują,

iż system ten ulega ekspresji w warunkach niedoboru żelaza oraz stresu kwasowego, a jego inaktywacja prowadzi do zmiany wirulencji szczepów *M. tuberculosis* (Hamidieh i wsp., 2020; Stupar i wsp., 2023).

1.8.5. „Sieroce" białka regulatorowe

Dane literaturowe wskazują, że w regulację procesów zachodzących w komórkach prątków, oprócz sparowanych TCSs zaangażowane są również „sieroce" kinazy i białka regulatorowe (Bretl i wsp., 2011; Kundu, 2018; Stupar i wsp., 2022).

1.8.5.1. Rv0195

Białko regulatorowe Rv0195 występuje w komórkach *M. tuberculosis*. Białko to wpływa na przeżywalność prątków gruźlicy w warunkach niedotlenienia i stresu oksydacyjnego, a jego inaktywacja zmniejsza zjadliwość prątków na modelu ludzkich monocytów THP-1 (Fang i wsp., 2013; Hegde, 2020).

1.8.5.2. Rv0260c

Białko regulatorowe Rv0260c (NnaR) występujące w komórkach prątków bierze udział w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm azotynów i azotanów. Dodatkowo, wykazano iż NnaR u *M. smegmatis* ściśle współpracuje z białkiem GlnR, co umożliwia komórkom prątków dostosowanie się do warunków związanych z niedoborem azotu (Antczak i wsp., 2018).

1.8.5.3. Rv0818

Białko regulatorowe Rv0818 (GlnR) wykazuje różne funkcje w obrębie rodzaju *Mycobacterium*. Dotychczasowe badania wskazują, iż GlnR reguluje asymilację azotynów i azotanów w komórkach *M. tuberculosis* oraz w warunkach stresu azotowego aktywuje geny zdolne do asymilacji różnych form azotu (Jeßberger i wsp., 2013; Agapova i wsp., 2019).

Białko GlnR, określane jako nietypowy i „sierocy" globalny regulator odpowiedzi z rodziny OmpR/PhoB, kontroluje transkrypcję ponad 1000 genów zaangażowanych w metabolizm azotu, węgla i fosforanów, działając zarówno jako aktywator jak i represor

(Shi i wsp., 2023). Białko GlnR i jego homologi są szeroko rozpowszechnione w komórkach prątków i innych aktynobakterii (Wang i wsp., 2015). Występują m.in. u *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *Streptomyces coelicolor*, *Saccharopolyspora erythraea* czy *Amycolatopsis mediterranei* (Shi i wsp., 2023). Przykładem genów regulowanych przez GlnR u *S. coelicolor* są geny kodujące enzymy asymilacji amonu (*glnII*, *gdhA*), redukcji azotynów (*nirB*) oraz rozkładu mocznika (*ureA*) (Pullan i wsp., 2011; Martin i wsp., 2021).

W budowie białka GlnR wyróżniamy N-końcową domenę odbiorczą (GlnR-REC) oraz C-końcową domenę wiążącą DNA (GlR_DBD) (Shi i wsp., 2023). W komórkach *M. smegmatis* GlnR reguluje ekspresję co najmniej 100 genów zaangażowanych m.in. w regulację cyklu cytrynianu metylu poprzez hamowanie transkrypcji operonu prpDBC (Liu i wsp., 2019), blokowanie aktywacji liazy izocytrynianowej, co pozwoliło na wykazanie jego udziału w regulacji metabolizmu kwasów tłuszczowych (Jenkins i wsp., 2013; Qi i wsp., 2021). Ponadto GlnR u *M. smegmatis* wpływa również na metabolizm cholesterolu poprzez regulację represora transkrypcji KstR (Ma i wsp., 2022).

1.8.5.4. Rv2884

Białko regulatorowe Rv2884 jak do tej pory, zostało słabo scharakteryzowane. Prawdopodobnie, bierze ono udział w adaptacji komórek prątków do warunków niedotlenienia (Gautam i wsp., 2019).

1.8.5.5. Rv3143

Białko regulatorowe Rv3143 będące składnikiem kompleksu Nuo, reguluje jego aktywność, wpływa na funkcje I kompleksu łańcucha oddechowego prątków oraz zwiększa wrażliwość na antybiotyki poprzez regulację przepuszczalności ściany komórkowej *M. smegmatis*. Komórki *M. tuberculosis* pozbawione funkcjonalnego białka Rv3143 wykazują uwrażliwienie na walinomycynę, która zmniejsza potencjał elektrochemiczny komórki oraz wpływa na nadekspresję genów wymaganych do oddychania beztlenowego. W komórkach prątków, pozbawionych genu *rv3145* dochodzi do aktywacji alternatywnych mechanizmów oddechowych (Płocińska i wsp., 2022).

1.8.5.6. „Sieroce” kinazy

W regulację procesów zachodzących w komórkach prątków, oprócz sparowanych TCSs oraz „sierocych” regulatorów odpowiedzi zaangażowane są również kinazy „sieroce” (Bretl i wsp., 2011; Kundu, 2018; Stupar i wsp., 2022). Dotychczas zidentyfikowano dwie kinazy – Rv3365c oraz Rv2998A. Jedynie kinaza histydynowa Rv3365c, wchodząca w skład operonu Rv3361c-Rv3365c została scharakteryzowana. Kinaza ta, aktywuje domniemane białko regulatorowe – Rv3363c, które może być zdolne do wyczuwania zmian zachodzących w środowisku komórki. Udowodniono, iż delecja genu *rv3365c* prowadzi do zmniejszenia zdolności komórek *M. tuberculosis* do zapobiegania apoptozie (Danelishvili i wsp., 2012). Brak natomiast w literaturze informacji na temat drugiej, sierocej kinazy Rv2998A.

1.9. Dwukomponentowy system transdukcji sygnału MnoSR

W skład dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MnoSR występującego u *M. smegmatis* wchodzi kinaza histydynowa MnoS (MSMEG_6238) oraz regulator odpowiedzi MnoR (MSMEG_6236). Analiza danych literaturowych potwierdziła, iż oba geny tworzą wspólny operon (*mnoSR*) i biorą udział w regulacji metabolizmu metylotroficznego u *M. smegmatis*. W obecności metanolu w pożywce hodowlanej oba białka regulują ekspresję dehydrogenazy metanolowej (MNO) zależnej od N, N-dimetylo-p-nitrozoaniliny (NDMA), która jest niezbędna do wzrostu *M. smegmatis* na metanolu. Zaobserwowano również, że regulator odpowiedzi MnoR wykazuje specyficzne wiązanie z domniemanym regionem promotora *mno* w warunkach *in vitro* co dodatkowo potwierdziło jego rolę w regulacji ekspresji *mno*. Dane literaturowe wskazują, iż system MnoSR jest zaangażowany w regulację ekspresji genu *msmeg_6239*, który koduje przypuszczalną dehydrogenazę 1,3-propanadiolu biorąc udział w regulacji metabolizmu alkoholi. Wykazano ponadto, że szczep *M. smegmatis* pozbawiony funkcjonalnego systemu MnoSR nie jest zdolny do wzrostu w obecności metanolu i 1,3-propanadiolu stanowiących jedyne źródła węgla wykazując zdolność do wzrostu w obecności formaldehydu (w przeciwieństwie do *Paracoccus denitrificans*), co pozwala stwierdzić, że regulacja MnoSR ogranicza się jedynie do regulacji metabolizmu alkoholi (Dubey i Jain, 2019).

W budowie kinazy histydynowej MnoS możemy wyróżnić zlokalizowaną na jej N-końcu domenę GAF, domenę kinazy histydynowej HisKA_3 zawierającą rdzeń kinazy i oraz domenę ATPazy (HATPaza) odpowiedzialną za aktywność ATPazy białka. Nazwa domeny GAF pochodzi od cyklicznej fosfodiesterazy specyficznej dla GMP [cGMP], cyklazy adenylowej i białek FhlA. Domena ta jest zaangażowana w wykrywanie i reagowanie na drugorzędowe cząsteczki przekaźnikowe do których należy m.in. cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan ([cGMP]), cykliczny adenozyno-3`,5`-monofosforan (cAMP) czy c-di-GMP. Dodatkowo stwierdzono, że budowa MnoS jest zbliżona do budowy kinaz histydynowych, DevS i Rv2027c występujących u *M. tuberculosis* – (Saini i wsp., 2004; Marchler-Bauer i wsp., 2015). Przeprowadzone badania potwierdziły, iż MnoS wykazuje aktywność autofosforylacji i fosfotransferazy w warunkach *in vitro*. MnoR, w przeciwieństwie do MnoS nie posiada zdolności do autofosforylacji, jednak po inkubacji z fosforylowanym MnoS, jest w stanie przyjąć od niego grupę fosforanową, co prowadzi do defosforylacji MnoS i fosforylacji MnoR, potwierdzając tym samym aktywność fosfotransferazy między tymi dwoma białkami. Miejscem fosforylacji w obrębie białka MnoR jest konserwatywna reszta asparaginianowa Asp60, co dodatkowo potwierdza interakcje występujące pomiędzy białkami MnoR i MnoS (Dubey i Jain, 2019).

1.10. MtrA-MtrB

W budowie dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MtrA-MtrB wyróżniamy kinazę MtrB oraz współpracujący z nią regulator odpowiedzi MtrA. System MtrA-MtrB jest niezbędny do przeżycia *M. tuberculosis*. W komórkach prątków system MtrA-MtrB bierze udział w regulacji procesów oddychania oraz wpływa na procesy podziału komórkowego (Kundu, 2018; Peterson i wsp., 2021).

Jak już wspomniano, regulator odpowiedzi MtrA (u *M. smegmatis* MSMEG_1874; u *M. tuberculosis* Rv3246c) wspólnie z kinazą histydynową MtrB (u *M. smegmatis* MSMEG_1875; u *M. tuberculosis* Rv3245c) wchodzi w skład jednego z TCSs występujących u mykobakterii (Malhotra i wsp., 2022; Stupar i wsp., 2022). Regulon MtrA obejmuje kilka genów zaangażowanych w procesy podziału komórkowego (Sharma i wsp., 2015) oraz metabolizm ściany komórkowej. MtrB jest białkiem związanym z błoną, z dwiema potencjalnymi domenami transbłonowymi, łącznikiem HAMP i domeną fosfoakceptorową His-kinazy A (Aravind i Ponting, 1999; Bilwes i in., 1999). Gen *mtrB* nie jest niezbędny do

wzrostu *prątków M. smegmatis i M. tuberculosis* (Zahrt i Diretic, 2000). Białko MtrA prątka gruźlicy wiąże się do regionów promotorowych co najmniej 45 genów (Gorla i wsp., 2018; Chatterjee i wsp., 2018), w tym hydrolazy *ripA* ściany komórkowej (Płocińska i wsp., 2012), transferazy mykolowej *fbpB* ściany komórkowej (Rajagopalan i wsp., 2010) oraz inicjatora replikacji *dnaA* (Fol i wsp., 2006). MtrA jest białkiem niezbędnym do wzrostu *M. tuberculosis*. Delecja genu *mtrA* w komórkach *M. smegmatis* powoduje wydłużenie komórek, z obecnymi rozgałęzieniami i wybrzuszeniami, co wskazuje na zaburzenia dotyczące podziału komórkowego. Dodatkowo, zaobserwowano zwiększoną wrażliwość mutanta Δ*mtrA M. smegmatis* na ryfampicynę oraz zwiększoną oporność na izoniazyd (Gorla i wsp., 2018).

W budowie białka MtrA wyróżniamy N-końcową domenę regulatorową oraz C-końcową domenę helisa-skręt-helisa (HTH) wykazującą zdolność do wiązania DNA (Friedland i wsp., 2007).

Dowiedziono, iż wpływ na zdolności regulacyjne MtrA w docelowych regionach ma zarówno acetylacja, do której dochodzi na drodze nieenzymatycznej acetylacji przez fosforan acetylu, jak również fosforylacja, co sugeruje występowanie alternatywnych mechanizmów regulacji systemu MtrA-B (Singh i wsp., 2021).

W związku ze wzrastającą liczbą wielolekoopornych szczepów *Mycobacterium* istnieje natychmiastowa potrzeba opracowania nowych preparatów przeciwdrobnoustrojowych o innej budowie i unikalnym mechanizmie działania, niż dotychczasowe tarcze dla obecnie stosowanych leków. Z tego względu zablokowanie działania dwuskładnikowego systemu MtrA-MtrB może być ważnym uzupełnieniem obecnie stosownego leczenia. Ze względu na to, iż system MtrA-MrtB jest niezbędny do przeżycia prątków, a inaktywacja genu *mtrA* prowadzi do znacznego zahamowania wzrostu prątków i zwiększonej wrażliwości na rifampicynę, system ten jest niezwykle atrakcyjnym celem dla odkrywania nowych leków. Zidentyfikowanie związków aktywnych biologicznie o działaniu hamującym funkcje białka MtrA, a także poznanie mechanizmów ich działania zaowocuje dalszym rozwojem nowatorskich leków co w konsekwencji może przyczynić się do skutecznej eliminacji gruźlicy (Peterson i wsp., 2021).

2. Cel badawczy

Wyszczególnione w ramach przygotowywanej pracy doktorskiej cele badawcze obejmują:

1. Ocena roli dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG_6236/MSMEG_6238 w globalnej regulacji metabolizmu u *M. smegmatis* poprzez:
   a. konstrukcję ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów: *msmeg_6236*, *msmeg_6238* oraz obu tych genów tj. *msmeg_6236/msmeg_6238*
   b. analizę tempa wzrostu skonstruowanych mutantów w obecności określonych źródeł azotu, węgla oraz ocena ich wrażliwość na wybrane związki m.in. antybiotyki
   c. przeprowadzenie globalnej analizy transkryptomu uzyskanych mutantów w warunkach głodzenia węglowego

2. Poznanie funkcji białka MtrA (*msmeg_1874*) w regulacji metabolizmu azotu u *M. smegmatis* poprzez:
   a. analizę oddziaływania białka His-MtrA z sekwencją promotorową genu *amtB* (*msmeg_2425*), którego produkt uczestniczy w transporcie amoniaku
   b. analizę tempa wzrostu mutantów Δ*mtrA* oraz Δ(*mtrA*/*glnR*) w obecności wybranych źródeł azotu
   c. wykonanie globalnej analizy transkryptomu mutantów Δ*mtrA* oraz Δ(*mtrA*/ *glnR*) w warunkach głodzenia azotowego

3. Materiały

3.1. Szczepy bakteryjne

Tabela 1. Szczepy bakteryjne wykorzystane w pracy.

Nazwa szczepu	Gatunek	Źródło
mc^2 155	*M. smegmatis*	Kolekcja szczepów Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* IBM PAN
ΔglnR	*M. smegmatis*	Kolekcja szczepów Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* IBM PAN
ΔmtrA	*M. smegmatis*	Kolekcja szczepów Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* IBM PAN
Δ(*mtrA/glnR*)	*M. smegmatis*	Szczep skonstruowany w ramach wykonanej pracy doktorskiej
Δmsmeg_6236	*M. smegmatis*	Szczep skonstruowany w ramach wykonanej pracy doktorskiej
Δmsmeg_6238	*M. smegmatis*	Szczep skonstruowany w ramach wykonanej pracy doktorskiej
Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238)*	*M. smegmatis*	Szczep skonstruowany w ramach wykonanej pracy doktorskiej
TOP10F′	*E. coli*	Szczep komercyjny (Invitrogen)

3.2. Podłoża mikrobiologiczne

W zależności od rodzaju przeprowadzanego eksperymentu w pracy korzystano z podłoży płynnych lub stałych, zestalonych 2% agarem (**Tabela 2.**).

Tabela 2. Wykaz podłoży mikrobiologicznych wykorzystanych w pracy.

Podłoże	Składnik	Skład procentowy lub objętość na L	pH
Luria-Bertani płynne (LB Broth)	Chlorek sodu (BioShop) Tryptone (BioShop) Ekstrakt drożdżowy (BioShop)	5 g 10 g 5 g	7
Luria-Bertani stałe (LB Agar)	Chlorek sodu (BioShop) Tryptone (BioShop) Ekstrakt drożdżowy (BioShop) Agar (BioShop)	5 g 10 g 5 g 2 %	7
Middlebrook 7H9 Broth	Middlebrook 7H9 (Difco) Tween 80 (Sigma Aldrich)	4,7 g 0,05 %	7
Middlebrook 7H9/OADC Broth	Middlebrook 7H9 (Difco) Tween 80 (Sigma Aldrich) Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	4,7 g 0,05 % 10 %	7
Middlebrook 7H10/OADC Agar	Middlebrook 7H10 Agar (Difco) Glicerol (Sigma Aldrich) Middlebrook OADC Enrichment (Difco)	19 g 0,5 % 10 %	7
YNB	Yeast Nitrogen Base (Bioshop) AD	1,74 g 10 %	7
Sauton pozbawiony źródeł azotu	Diwodorofosforan potasu (BioShop) Siarczan magnezu (Sigma Aldrich) Kwas cytrynowy (Sigma Aldrich) Cytrynian żelaza (III) (Sigma Aldrich) Siarczan cynku (Sigma Aldrich) Glicerol (Sigma Aldrich) Tyloxapol (Sigma Aldrich)	0,05 % 0,05 % 0,2 % 0,005 % 0,0001 % 0,2 % 0,015 %	6,8 – 7,2
Sauton pozbawiony źródeł węgla	Diwodorofosforan potasu (BioShop) Siarczan magnezu (BioShop) Siarczan cynku (Sigma Aldrich) Chlorek amonu (Sigma Aldrich) Tyloxapol (Sigma Aldrich)	0,05 % 0,05 % 0,0001 % 0,16 % 0,015 %	6,8 – 7,2
LB do autoindukcji	Trypton (BioShop) Ekstrakt drożdżowy (BioShop) Wodorofosforan sodu (BioShop) Diwodorofosforan potasu (BioShop) Chlorek amonu (Sigma Aldrich) Siarczan sodu (Sigma Aldrich)	1 % 0,5 % 1,25 M 1,25 M 2,5 M 0,25 M	

	Glicerol (Sigma Aldrich) Glukoza (Sigma Aldrich) L-laktoza (Sigma Aldrich) Siarczan magnezu x $7H_2O$ (BioShop) Chlorek żelaza (III) x $6H_2O$ (BioShop) Chlorek wapnia x $2H_2O$ (BioShop) Chlorek manganu (II) x $4H_2O$ (BioShop) Siarczan cynku x $7H_2O$ (Sigma Aldrich) Chlorek kobaltu (II) x $6H_2O$ (BioShop) Chlorek miedzi (II) x $2H_2O$ (BioShop) Chlorek niklu (II) x $6H_2O$ (Sigma Aldrich) Manganian (VI) sodu x $2H_2O$ (BioShop) Selenian sodu (Sigma Aldrich) Kwas borowy (Sigma Aldrich)	25 % 2,5 % 10 % 1 M 50 µM 20 mM 10 mM 10 mM 2 mM 2 mM 2 mM 2 mM 2 mM 2 mM	

3.3. Czynniki selekcyjne dodawane do podłoży

Tabela 3. Wykaz substancji selekcyjnych dodawanych do podłoży.

Czynnik selekcyjny	Bakteria	Stężenie
Ampicylina (BioShop)	*E. coli*	100 µg/ml
Gentamycyna (Sigma Aldrich)	*E. coli*	10 µg/ml
Higromycyna (BioShop)	*E. coli* *M. smegmatis*	200 µg/ml 50 µg/ml
Kanamycyna (BioShop)	*E. coli* *M. smegmatis*	50 µg/ml 25 µg/ml
Sacharoza (BioShop)	*M. smegmatis*	20 g/ml
X-gal (BioShop)	*M. smegmatis*	40 µg/ml

3.4. Syntetyczne oligonukleotydy

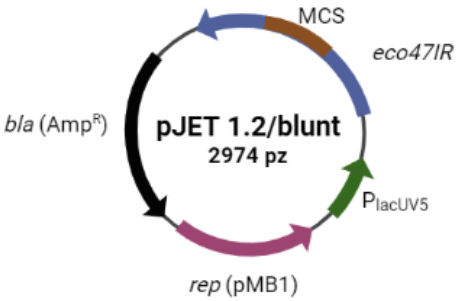
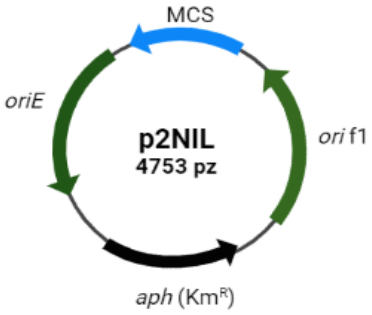
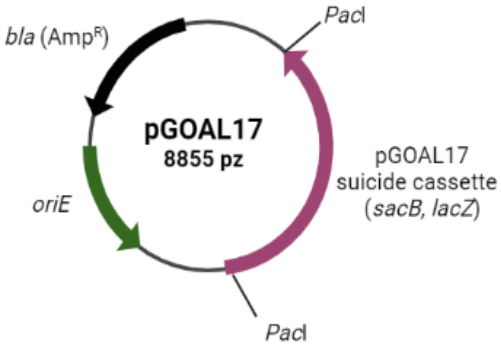
Tabela 4. Wykaz syntetycznych oligonukleotydów wykorzystywanych w pracy badawczej.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja nukleotydowa (5`→3`)	Zastosowanie
Oligonukleotydy wykorzystane w reakcji amplifikacji analizowanych genów		
Ms6238GR1bScaI-s Ms6238GR2HindIII-r	cagtactCGTTGACAAGGCCACCATGC caagcttCATCGAGGATGAGGTGACGC	Amplifikacja 5` fragmentu genu *msmeg_6238*
Ms6238GR3bHindIII-s Ms6238GR4bBamHI-r	caagcttGGCACGCAGGATCTGGTCGA cggatcCGGTGGTCGCGGAGATGAAC	Amplifikacja 3` fragmentu genu *msmeg_6238*
Ms6236GR1b-ScaI-s Ms6236GR2b-HindIII-r	cagtactACGGCCCACCGAAACTCGTG caagctTCACGTTCCAGCAGCGA	Amplifikacja 5` fragmentu genu *msmeg_6236*
Ms6236GR3HindIII-s Ms6236GR4BamHI-r	caagcttTGACAGTGCGTTCGACTCCCG cggatccGCGCACCGCGACTAGTTCGT	Amplifikacja 3` fragmentu genu *msmeg_6236*
Oligonukleotydy wykorzystane w reakcji potwierdzenia genotypu uzyskanych mutantów metodą PCR i hybrydyzacji typu Southern Blotting		
Ms6238BglII-s Ms6238XbaI-r	cagatctGTGGCCGAAGCGGCCCGCAC ctctagaTTATCGTCTGTTCCCTTCGGTCCTGG	Potwierdzenie genotypu mutanta Δ*msmeg_6238* SCO/DCO
Ms6236BamHI-s Ms6236XbaI-r	cggatccATGACCGTCACGACGCGCGAG ctctagaTTAGATCAACCCGCGCTTGCTCG	Potwierdzenie genotypu mutanta Δ*msmeg_6236* SCO/DCO
Ms6238BglII-s Ms6236XbaI-r	cagatctGTGGCCGAAGCGGCCCGCAC ctctagaTTAGATCAACCCGCGCTTGCTCG	Potwierdzenie genotypu podwójnego mutanta Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) SCO/DCO
Msmeg_5784-probe-F Msmeg_5784-probe-R	CGGATCCTTGGATCTACTGCTACTGACCGTCGACC CTCTAGACTCACTGACTGGTCAACCGCCCC	Potwierdzenie genotypu podwójnego mutanta Δ(*mtrA*/*glnR*)

Oligonukleotydy wykorzystane w reakcji qRT-PCR do analizy ekspresji genów		
Msmeg_6236_RT PCR-s Msmeg_6236_RT PCR-r	AAGTCCGATCCGGCCGAGAGC CGCTGCTGGAACGTGAGGACG	Analiza ekspresji genu *msmeg_6236*
Msmeg_6238_RT PCR-s Msmeg_6238_RT PCR-r	ACCGGAACTGCGCCAGGTGC CTCATCCTCGATGCCGACGGG	Analiza ekspresji genu *msmeg_6238*
MsmegSigA-F MsmegSigA-R	CCAAGGGCTACAAGTTCTCG TGGATCTCCAGCACCTTCTC	Analiza ekspresji genu *sigA*
MsaceARTPCR-s MsaceARTPCR-r	GTCGTCGAGGAGCACACCCTGG CTGCCAGCCGGACAGGTAGATGG	Analiza ekspresji genu *msmeg_0911*
MswhiB4RTPCR-s MswhiB4RTPCR-r	AGCACCGGGACTCCGAAGCG CGATTGTCGAGCGCGTCCG	Analiza ekspresji genu *msmeg_6199*
MsrelARTPCR-s MsrelARTPCR-r	TGTCCAGCTTGGTCACACCGTCG AGCTCGGCATGGACACCACCAC	Analiza ekspresji genu *msmeg_2965*
Oligonukleotydy wykorzystane do badania oddziaływań białek z sekwencjami DNA z wykorzystaniem metody EMSA		
Ms_2425s_Cy5 Ms_2425-Prev	[Cyanine5]GAGTGTTTGCGGGGCGTTAC TTTGTGTGAACCTCCTTGG	Amplifikacja sekwencji fragmentu promotora genu *msmeg_2425*
Oligonukleotydy wykorzystane do potwierdzenia wektorów ekspresyjnych		
MV_306-F MV_306-R	GTGGATAACCGTATTACCGC AAGGCCCAGTCTTTCGACTGAG	Potwierdzenie integracji wektora pMV306Km z wklonowanymi genami *msmeg_6236*, *msmeg_6238* i *msmeg_6236/6238* do chromosomu *M. smegmatis*

3.5. Wektory plazmidowe

Tabela 5. Wykaz komercyjnych wektorów plazmidowych wykorzystanych w pracy.

Wektor	Charakterystyka
pJET1.2/blunt (Thermo Scientific)  	plazmid wykorzystywany do klonowania produktów reakcji PCR z wykorzystaniem polimerazy Taq, zawiera gen *bla* warunkujący oporność na ampicylinę (Amp^R) wielkość plazmidu: 2974 pz
p2NIL (Parish i Stoker, 2000)  	plazmid rekombinacyjny, posiadający miejsce replikacji dla *E. coli* – *oriE*, gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę (Km^R) oraz miejsce restrykcyjne PacI pozwalające na wklonowanie kasety markerowej z plazmidu pGOAL17 wielkość plazmidu: 4753 pz
pGOAL17 (Parish i Stoker, 2000)  	plazmid posiadający miejsce replikacji dla *E. coli* – *oriE*, gen *bla* warunkujący oporność na ampicylinę (Amp^R) oraz kasetę markerową zawierającą gen „samobójczy” *sacB,* którego aktywacja prowadzi do rozkładu sacharozy do toksycznego dla mykobakterii lewanu oraz gen *lacZ* odpowiedzialny za rozkład X-galu do niebieskiego związku; kaseta markerowa zawiera miejsca restrykcyjne PacI wielkość plazmidu: 8855 pz

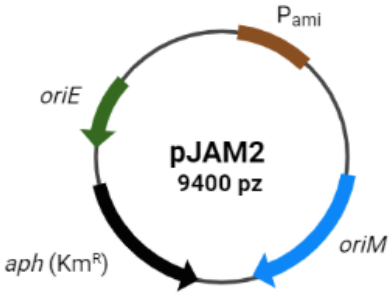
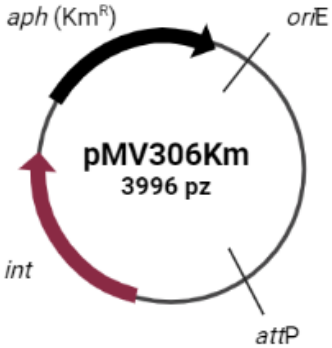
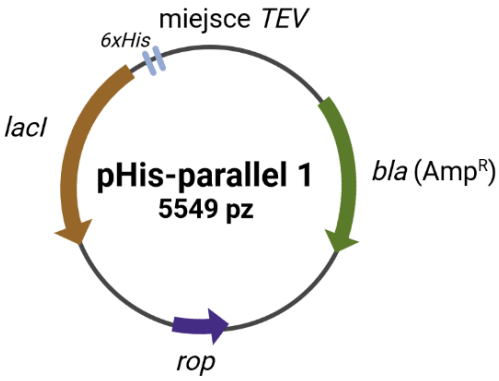
pJAM2 (Triccas, 1998)  	plazmid integracyjny posiadający miejsce replikacji dla *E. coli* – *oriE*, dla mykobakterii – *ori myco*, gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę (Km^R), plazmid posiadający również promotor dla acetamidazy wielkość plazmidu: 9400 pz
pMV306Km (Med-Immune Inc.)  	mykobakteryjny plazmid integracyjny posiadający gen kodujący integrazę faga L5 oraz gen *aph* warunkujący oporność na kanamycynę (Km^R) wielkość plazmidu: 3996 pz
pHis (Sheffield i wsp., 1999)  	wektor ekspresyjny posiadający indukowany promotor P_{T7} umożliwiający oczyszczanie rekombinowanych białek w fuzji ze znacznikiem His wielkość plazmidu: 5549 pz

Tabela 6. Wykaz wektorów skonstruowanych w ramach realizowanych badań.

Wektor	Charakterystyka
pKS1	Wektor pJET1.2/blunt niosący fragment 5` genu *msmeg_6238* o wielkości 1010 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII
pKS2	Wektor pJET1.2/blunt niosący fragment 3` genu *msmeg_6238* o wielkości 1101 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i BamHI
pKS3	Wektor pJET1.2/blunt niosący fragment 5` genu *msmeg_6236* o wielkości 1264 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy ScaI i HindIII
pKS4	Wektor pJET1.2/blunt niosący fragment 3` genu *msmeg_6236* o wielkości 1360 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i BamHI
pKS5	Wektor p2NIL niosący fragment genu *msmeg_6238* o wielkości 1101 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i ScaI
pKS6	Wektor p2NIL niosący fragment genu *msmeg_6236* o wielkości 1360 pz, Km^R , ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy HindIII i ScaI
pKS7	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalny gen *msmeg_6238*, Km^R
pKS8	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalny *gen msmeg_6236*, Km^R
pKS9	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalne geny *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*, Km^R
pKS10	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalny gen *msmeg_6238* oraz kasetę z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km^R,
pKS11	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalny gen *msmeg_6236* oraz kasetę z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km^R,
pKS12	Wektor p2NIL niosący niefunkcjonalne geny *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238* oraz kasetę z wektora pGOAL17, ograniczoną sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym PacI, Km^R,
pKS13	Wektor pJET1.2/blunt niosący gen *msmeg_6236* o wielkości 651 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BamHI/XbaI
pKS14	Wektor pJET1.2/blunt niosący gen *msmeg_6238* o wielkości 1152 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BglII/XbaI
pKS15	Wektor pJET1.2/blunt niosący gen *msmeg_6236/6238* o wielkości 1799 pz, Amp^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BglII/XbaI

pKS16	Wektor pJAM2 niosący gen *msmeg_6236* o wielkości 651 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BamHI/XbaI
pKS17	Wektor pJAM2 niosący gen *msmeg_6238* o wielkości 1152 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BamHI/XbaI
pKS18	Wektor pJAM2 niosący gen *msmeg_6236/6238* o wielkości 1799 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BamHI/XbaI
pKS19	Wektor pMV306Km niosący gen *msmeg_6236* o wielkości 651 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym HindIII/XbaI
pKS20	Wektor pMV306Km niosący gen *msmeg_6238* o wielkości 1152 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym HindIII/XbaI
pKS21	Wektor pMV306Km niosący gen *msmeg_6236/6238* o wielkości 1799 pz, Km^R, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym HindIII/XbaI
pKS22	Wektor pHIS niosący gen *mtrA msmeg_1874*, ograniczony sekwencjami rozpoznawanymi przez enzym BglII/HindII

3.6. Enzymy

Tabela 7. Wykaz enzymów restrykcyjnych wykorzystanych w ramach realizowanych badań.

Nazwa enzymu	Pochodzenie bakteryjne	Rozpoznawana sekwencja nukleotydowa 5'↔3' oraz miejsce cięcia nici DNA
BamHI	*Bacillus amyloliquefaciens* H	G ↓ G A T C C C C T A G ↑ G
BglII	*Bacillus globigii*	A ↓ G A T C T T C T A G ↑ A
EcoRI	*Escherichia coli* RY 13	G ↓ A A T T C C T T A A ↑ G
HindIII	*Haemophilus influenzae* R_d	A ↓ A G C T T T T C G A ↑ A
KpnI	*Klebsiella pneumoniae* OK8	G G T A C ↓ C C ↑ C A T G G
PacI	*Pseudomonas alcaligenes*	T T A A T ↓ T A A A A T ↑ T A A T T
PvuII	*Proteus hauseri*	C A G ↓ C T G G T C ↑ G A C
ScaI	*Streptomyces caespitosus*	A G T ↓ A C T T C A ↑ T G A
XbaI	*Xanthomonas badrii*	T ↓ C T A G A A G A T C ↑ T

Tabela 8. Wykaz pozostałych enzymów wykorzystanych w ramach realizowanych badań.

Nazwa enzymu	Zastosowanie	Stężenie
Ligaza DNA T4 (Invitrogen)	Proces ligacji DNA	20 U/µl
Polimeraza AccuPrime Pfx (Invitrogen)	Reakcja amplifikacji PCR	5 U/µl
Polimeraza Taq DNA (Sigma)	Reakcja amplifikacji PCR	5 U/µl
TURBO DNA-free™ Kit (Ambion)	Trawienie DNA	2 U/µl
RNaza (ThermoFisher Scientific)	Trawienie RNA	5 U/µl

3.7. Mieszaniny reakcyjne

Tabela 9. Wykaz mieszanin reakcyjnych wykorzystanych w ramach przeprowadzonych badań.

Reakcja amplifikacji PCR	
DNA	1 µg
Bufor reakcyjny	2 – 5 µl
DMSO 8%	2 µl
Oligonukleotydy „sense" i „reverse" (10 pmol)	0,5 – 1 µl każdy
Polimeraza DNA	1 U
H_2O	do objętości 20 – 50 µl w zależności od reakcji
Ligacja	
DNA	stężenie: 300 ng
Wektor plazmidowy	stężenie: 100 ng
Bufor reakcyjny 10x stężony	2 µl
Ligaza DNA T4	0,5 – 1 µl (1 U)
H_2O	do objętości 10 – 20 µl w zależności od reakcji
Trawienie restrykcyjne	
DNA	stężenie: 1 µg
Bufor reakcyjny 10x stężony	2 µl
Enzym restrykcyjny	1 – 2 µl (1 U)
H_2O	do objętości 10 – 20 µl w zależności od reakcji

Synteza cDNA	
RNA	Stężenie: 1 µg
Bufor reakcyjny	1 µl
Starter heksanukleotydowy	1 µl
SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix kit	10 µl
SuperSpriptIII/RNase OUT Enzyme Mix	2 µl
H_2O DEPC	do objętości 20 µl
Reakcja qRT-PCR	
cDNA	50 ng
PowerUp™SYBR™Green Master Mix [2x]	5 µl
Oligonukleotydy (10 µM)	0,3 µl każdy
H_2O	do objętości 10 µl
EMSA	
Bufor – NEB1	2 µl
Glicerol 50%	2 µl
BSA (10 mg/ml)	0,2 µl
DNA znakowany Cy5	35 nM
Białko	0,1 – 10 µM
H_2O	do objętości 20 µl

3.8. Bufory i roztwory

Tabela 10. Wykaz buforów i roztworów wykorzystanych do przeprowadzenia rozdziałów elektroforetycznych.

Elektroforeza agarozowa – Bufor TAE (bufor octanowy) 50x stężony	
Trizma – base	2 M
EDTA	0,5 M
Elektroforeza agarozowa – Bufor TBE 10x stężony	
Trizma – base	0,089 M
EDTA	0,002 M
Kwas borowy	0,089 M

Elektroforeza poliakrylamidowa – Bufor TGB 5x stężony	
Trizma – base	0,025 M
Glicyna	0,192 M
SDS	0,1%

Tabela 11. Wykaz buforów i roztworów obciążających wykorzystanych do obciążania próbek.

Bufor do obciążania próbek DNA 6x stężony	
Glicerol	30%
Błękit bromofenolowy	0,25%
Bufor do obciążania próbek białkowych 4x stężony	
Glicerol	40%
Błękit bromofenolowy	0,4%
SDS	8%
DTT	400 mM
Tris-HCl (pH=6,8)	200 mM

Tabela 12. Wykaz buforów wykorzystanych do oczyszczania białek.

Bufor wiążący A1 do oczyszczania białka MtrA	
Triton X-100	0,5%
Imidazol	10 mM
NaCl	1 M
Tris-HCl (pH=7,5)	50 mM
Glicerol	10%
Bufor płuczący A2 do oczyszczania białka MtrA	
Triton X-100	0,1%
Imidazol	10 mM
NaCl	1 M
Tris-HCl (pH=7,5)	50 mM
Glicerol	10%
Bufor elucyjny do oczyszczania białek	
Imidazol	0,5 M
NaCl	0,5 M
Tris-HCl (pH=7,5)	50 mM
Glicerol	10%

Tabela 13. Wykaz buforów wykorzystanych do przeprowadzenia hybrydyzacji metodą Southern blot.

Reakcja hybrydyzacji typu Southern blot		
Roztwór depurynujący	HCl	250 mM
Roztwór denaturujący	$NaCl_2$ NaOH	1,5 M 0,5 M
Roztwór neutralizujący (pH=7,5)	$NaCl_2$ Tris-HCl (pH=7,5)	1,5 M 0,5 M
Bufor SSC 20x stężony	Cytrynian sodu NaCl	0,3 M 3 M
Bufor hybrydyzacyjny	NaCl Odczynnik blokujący	0,5 M 4 %
Bufor przemywający I (ang. ***primary wash buffer***)	Mocznik SDS NaH_2PO_4 (pH=7) NaCl $MgCl_2$ Odczynnik blokujący	2 M 0,1% 50 mM 150 mM 1 mM 0,2 %
Bufor przemywający II 20x stężony (pH=10) (ang. ***secondary wash buffer***)	NaCl Trizma base	2 M 1 M
Bufor przemywający II	Bufor przemywający II 20x stężony $MgCl_2$	Rozcieńczony 1:20 0,2 mM

Tabela 14. Bufory wykorzystane do przygotowania komórek kompetentnych *E. coli*.

Bufor I	
KOAc	30 mM
$MnCl_2$	50 mM
RbCl	100 mM
$CaCl_2$	10 mM
Glicerol	15%
Bufor II (pH=7)	
NaMOPS	10 mM
$CaCl_2$	75 mM
RbCl	10 mM
Glicerol	15%

Tabela 15. Pozostałe bufory i roztwory.

Bufor TE	
Tris-HCl (pH=8) **EDTA (pH=8)**	10 mM 1 mM
Mieszanina do ekstrakcji chromosomalnego DNA	
Chloroform:alkohol izoamylowy	Stosunek 24:1

3.9. Żele wykorzystane do rozdziałów elektroforetycznych

Tabela 16. Żele wykorzystane do przeprowadzenia rozdziałów elektroforetycznych fragmentów DNA i białek.

Żele agarozowe do rozdziału fragmentów DNA	
Agaroza w buforze TAE	1%
Bromek etydyny	0,5 µg/ml
Żele agarozowe do rozdziału kompleksów DNA:białko (EMSA)	
Agaroza w buforze TBE 0,5x stężonym	2%
Żele poliakrylamidowe do rozdziału białek (SDS-PAGE)	
Żel rozdzielający	
Akrylamid	12%
Tris-HCl (pH=8,8)	0,36 M
SDS	0,1%
APS	1%
TEMED	0,1%
Żel zatężający	
Akrylamid	5%
Tris-HCl (pH=6,8)	0,1 M
SDS	0,1%
APS	1%
TEMED	0,1%

3.10. Markery wielkości

Tabela 17. Markery wielkości wykorzystane do określenia wielkości fragmentów DNA i białek.

Marker wielkości DNA	
GeneRuler™ 1kb (ThermoFisher Scientific)	Wielkość fragmentów DNA: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pz

GeneRuler™ 100 pz (ThermoFisher Scientific)	Wielkość fragmentów DNA: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pz
Marker wielkości białek	
Unstained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific)	Wielkość rekombinowanych białek: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 150 250 kDa

3.11. Zestawy komercyjnych odczynników

Tabela 18. Zestawy komercyjne wykorzystane podczas prowadzonych analiz.

Nazwa i producent	Zastosowanie
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)	Zestaw do izolacji plazmidowego DNA
QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)	Zestaw do elucji fragmentów DNA z żelu agarozowego
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)	Zestaw do oczyszczania produktów reakcji PCR
ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System (Amersham Biosciences)	Zestaw do hybrydyzacji typu Southern blot
SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen)	Zestaw do odwrotnej transkrypcji
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific)	Zestaw do qRT-PCR
Bradfort Reagent (Bioshop)	Zestaw do pomiaru stężenia białka
riboPOOL™ (siTOOLs Biotech GmbH)	Zestaw do rybodeplecji
KAPA Stranded RNA-seq Library Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS)	Zestaw do przygotowania bibliotek RNA-seq
Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)	Zestaw do analizy bibliotek
Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent)	Zestaw do sprawdzenia jakości preparatów RNA

3.12. Odczynniki chemiczne

Tabela 19. Odczynniki chemiczne wykorzystane podczas realizacji badań.

Odczynniki chemiczne
1,3-propanadiol ($C_3H_8O_2$) (Sigma Aldrich)
Acetamid (C_2H_5NO) (Sigma Aldrich)
Agar (BioShop)
Agaroza (Sigma Aldrich)
Bromek etydyny ($C_{21}H_{20}BrN_3$) (Sigma Aldrich)
Akrylamid (C_3H_5NO) (Sigma Aldrich)
Alantoina ($C_4H_6N_4O_3$) (Sigma Aldrich)
Alkohol izoamylowy ($C_5H_{12}O$) (Sigma Aldrich)
Ampicylina ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) (Sigma Aldrich)
Apramycyna ($C_{21}H_{41}N_5O_{11}$) (Sigma Aldrich)
Azotan sodu ($NaNO_3$) (Sigma Aldrich)
Azotyn sodu ($NaNO_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek amonu (NH_4Cl) (Sigma Aldrich)
Chlorek kobaltu II ($CoCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek magnezu ($MgCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek manganu ($MnCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek miedzi ($CuCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek niklu ($NiCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek sodu ($NaCl$) (Sigma Aldrich)
Chlorek wapnia ($CaCl_2$) (Sigma Aldrich)
Chlorek żelaza (III) ($FeCl_3$) (Sigma Aldrich)
Cytrynian sodu ($Na_3C_6H_5O_7$) (Sigma Aldrich)
Cytrynian żelaza (III) ($C_6H_5FeO_7$) (Sigma Aldrich)
Dihydrostreptomycyna ($C_{21}H_{41}N_7O_{12}$) (Sigma Aldrich)
Ditiotreitol (DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$) (Sigma Aldrich)
Diwodorofosforan potasu (DKH_2PO_4) (Sigma Aldrich)
Dimetylosulfotlenek (DMSO, C_2H_6OS) (BioShop)
DNazol (Invitrogen)
Dodecylo siarczan sodu (SDS, $C_{12}H_{25}NaO_4S$) (Sigma Aldrich)

Ekstrakt drożdżowy (Sigma Aldrich)

Etambutol ($C_{10}H_{24}N_2O_2$) (Sigma Aldrich)

Etanol (C_2H_6O) (Sigma Aldrich)

Galaktoza ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma Aldrich)

Glicerol ($C_3H_8O_3$) (Sigma Aldrich)

Glukoza ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma Aldrich)

Hydantoina ($C_3H_4N_2O_2$) (Sigma Aldrich)

Imidazol ($C_3H_4N_2$) (Sigma Aldrich)

Izoniazyd ($C_6H_7N_3O$) (Sigma Aldrich)

Izopropanol (C_3H_8O) (Merck)

Kanamycyna ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$) (BioShop)

Octan potasu ($C_2H_3O_2$) (Sigma Aldrich)

Ksyloza ($C_5H_{10}O_5$) (Sigma Aldrich)

Kwas borowy (H_3BO_3) (Sigma Aldrich)

Kwas cytrynowy ($C_6H_8O_7$) (Sigma Aldrich)

Kwas glutaminowy ($C_5H_9NO_4$) (Sigma Aldrich)

Kwas moczowy ($C_5H_4N_4O_3$) (Sigma Aldrich)

Kwas solny (HCl) (Sigma Aldrich)

Laktoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma Aldrich)

L-histydyna ($C_6H_9N_3O_2$) (Sigma Aldrich)

L-leucyna ($C_6H_{13}NO_2$) (Sigma Aldrich)

L-Prolina ($C_5H_9NO_2$) (Sigma Aldrich)

Maltoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma Aldrich)

Manganian sodu (Na_2MnO_4) (Sigma Aldrich)

Mannoza ($C_6H_{12}O_6$) (Sigma Aldrich)

Metanol (CH_3OH) (Sigma Aldrich)

Metionina ($C_5H_{11}NO_2S$) (Sigma Aldrich)

Mocznik (CH_4N_2O) (Sigma Aldrich)

Mrówczan sodu (HCOONa) (Sigma Aldrich)

Nadsiarczan amonu (APS, $(NH_4)_2S_2O_8$) (Sigma Aldrich)

Octan sodu ($C_2H_3NaO_2$) (Sigma Aldrich)

Ofloksacyna ($C_{18}H_{20}FN_3O_4$) (Sigma Aldrich)

Pirogronian sodu ($C_3H_3NaO_3$) (Sigma Aldrich)

Rezazuryna ($C_{12}H_7NO_4$) (Sigma Aldrich)

Rifampicyna ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$)

RNaza (Sigma Aldrich)

Ryboza ($C_5H_{10}O_5$) (Sigma Aldrich)

Sacharoza ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Sigma Aldrich)

Selenin sodu (Na_2SeO_4) (Sigma Aldrich)

Seryna ($C_3H_7NO_3$) (Sigma Aldrich)

Siarczan amonu ($(NH_4)_2SO_4$) (Sigma Aldrich)

Siarczan cynku ($ZnSO_4$) (Sigma Aldrich)

Siarczan magnezu ($MgSO_4$) (Sigma Aldrich)

Sisomycyna ($C_{19}H_{37}N_5O_7$) (Sigma Aldrich)

Streptomycyna ($C_{21}H_{39}N_7O_{12}$) (Sigma Aldrich)

Surowicza albumina wołowa (BSA) (Sigma Aldrich)

TEMED (N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina, $C_6H_{16}N_2$) (Sigma Aldrich)

Tetracyklina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) (Sigma Aldrich)

Treonina ($C_4H_9NO_3$) (Sigma Aldrich)

Tris ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma Aldrich)

Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3HCl$) (Sigma Aldrich)

TRIzol (Sigma Aldrich)

Trypton (Sigma Aldrich)

Tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) (Sigma Aldrich)

Tyloksapol ($-[C_{15}H_{21}O(C_2H_4O)_m]_n-$) (Sigma Aldrich)

Wankomycyna ($C_{66}H_{75}N_9O_{24}Cl_2$) (Sigma Aldrich)

Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4) (Sigma Aldrich)

Wodorotlenek sodu (NaOH) (Sigma Aldrich)

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo β-D-galaktopiranozyd, $C_{14}H_{15}BrClNO_6$) (Sigma Aldrich)

B-merkaptoetanol ($HSCH_2CH_2OH$) (Sigma Aldrich)

3.13. Aparatura

Tabela 20. Sprzęt laboratoryjny wykorzystany podczas prowadzonych analiz.

Sprzęt laboratoryjny
Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent)
Aparat do elektroporacji (BioRad GenePulser)
Densoksymetr DENSILAMETR II (Erba Lachema)
Homogenizator FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals)
Wywoływarka klisz rentgenowskich Medical X-ray Processor (Kodak)
Sekwenator NextSeq 500 (Illumina)
Spektrofotometr do płytek 96-dołkowych Tecan Infinite (TK Biotech)
Spektrofotometr/Fluorymetria DS-11 FX (DeNovix)
System wizualizacji Azure400 (Azure Biosystems)
Termocykler Veriti™ 96-well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems™)
Termocykler QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific)
UV Stratalinker 1800 (Stratagene)
Wirówka do probówek typu Eppendorf MiniSpin® (Eppendorf)
Wirówka do próbek typu Falcon 5804 (Eppendorf)
Wytrząsarka laboratoryjna (Infors Orbitron)

4. Metody

4.1. Hodowle bakteryjne

4.1.1. Hodowle komórek *E. coli*

Hodowle komórek *E. coli* w zależności od rodzaju eksperymentu prowadzono w podłożu płynnym LB (w szklanych probówkach lub kolbach) lub na podłożu stałym zestalonym agarem (na szalkach Petriego, z dodatkiem 2 g agaru na 100 ml podłoża) (**Tabela 1.**, **Tabela 2.**). Hodowle prowadzono przez 24 godziny, w temperaturze 37°C, hodowle płynne dodatkowo wytrząsając. W zależności od etapu i rodzaju eksperymentu do podłoża dodawano określone antybiotyki oraz inne substancje pozwalające m.in. na selekcję uzyskiwanych klonów (**Tabela 3.**).

4.1.2. Hodowle *M. smegmatis*

Hodowle *M. smegmatis* prowadzono na podłożu stałym Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC w temperaturze 37°C oraz na podłożu płynnym 7H9 z dodatkiem OADC w zależności od rodzaju eksperymentu przez okres 2 do 4 dni w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (**Tabela 1.**, **Tabela 2.**). Dodatkowo, w zależności od etapu eksperymentu do podłoża dodawano określone antybiotyki oraz inne substancje pozwalające m.in. na selekcję uzyskiwanych klonów (**Tabela 3.**).

4.2. Izolacja plazmidowego DNA

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzano wg protokołu obejmującego etap lizy komórek, związania plazmidowego DNA na kolumnie, jego przemywania i elucji, z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do izolacji Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) i protokołu producenta (**Tabela 5.**, **Tabela 6.**, **Tabela 18.**).

4.3. Izolacja chromosomalnego DNA

Izolację chromosomalnego DNA z komórek *M. smegmatis* (mutanty SCO, mutanty DCO) przeprowadzano poprzez mechaniczną dezintegrację komórek. Komórki *M. smegmatis* pobierano ezą w warunkach sterylnych z podłoża stałego i zawieszano w 200 µl buforu TE z dodatkiem kulek cyrkoniowych (średnica 0,1 mm). Tak przygotowane

komórki rozbijano dwukrotnie z wykorzystaniem homogenizatora – FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals) przez 45 sekund, następnie prowadzono 5 minutową inkubację w łaźni wodnej, po czym przeprowadzano lizę komórek dodając do zawiesiny 200 µl DNAzolu. W kolejnym etapie do zawiesiny dodawano 200 µl mieszaniny chloroform:alkohol izoamylowy w stosunku 24:1, dokładnie mieszano, inkubowano 10 minut na lodzie, a następnie wirowano przy prędkości 49000 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Po zwirowaniu przenoszono górną, wodną warstwę (ok. 400 µl) do nowej probówki typu Eppendorf, dodawano 1 ml 96% alkoholu etylowego (96% EtOH) oraz 0,05 objętości 5 M octanu sodu (5 M Ack) w celu precypitacji DNA. Próbki inkubowano 10 minut na lodzie, a następnie wirowano przy prędkości 49000 x g, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Po zwirowaniu usuwano supernatant, a osad zawieszano w 500 µl 70% alkoholu etylowego (70% EtOH), wirowano przy prędkości 49000 x g, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Po wirowaniu dokładnie usuwano supernatant, po czym osad suszono w 58°C przez 15 minut. Po wysuszeniu osad zawieszano w 100 µl H_2O (H_2O dejonizowana), a do próbek dodawano 1 µl RNAzy w stężeniu 100 µg/ml, po czym próbki inkubowano w 37°C przez 30 minut (**Tabela 15.**, **Tabela 19.**).

4.4. Reakcja amplifikacji DNA

Reakcję amplifikacji DNA przeprowadzano z wykorzystaniem enzymu – polimerazy DNA (**Tabela 8.**, **Tabela 9.**) oraz dedykowanych dla poszczególnych eksperymentów syntetycznych oligonukleotydów (**Tabela 4.**). W zależności od rodzaju eksperymentu i dalszego przeznaczenia produktów reakcji korzystano z następujących polimeraz: polimerazy DNA AccuPrime Pfx (Invitrogen) wykorzystanej do uzyskania bardzo wiernej amplifikacji fragmentów DNA przeznaczonych do klonowania, oraz polimerazy Taq DNA (Sigma) wykorzystanej m.in. do potwierdzenia uzyskanych mutantów DCO.

Reakcje amplifikacji prowadzono zgodnie z załączonym protokołem dedykowanym dla danej polimerazy, w objętości 25 µl lub 50 µl, z dodatkiem dimetylo-sulfotlenku (DMSO), z wykorzystaniem termocyklera Veriti™ (Applied Biosystems). W zamieszczonych poniżej tabelach (**Tabela 21.**, **Tabela 22.**) przedstawione zostały profile temperaturowo – czasowe dla wykorzystywanych polimeraz.

Tabela 21. Profil temperaturowo – czasowy reakcji PCR dla polimerazy AccuPrime Pfx (Invitrogen).

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95	120	1
Denaturacja	95	15	35
Przyłączanie starterów	Temperatura dedykowana dla danej pary oligonukleotydów	30	
Elongacja	68	60 lub 120	
Chłodzenie	4	∞	1

Tabela 22. Profil temperaturowo – czasowy reakcji PCR dla polimerazy Taq DNA (Sigma).

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	94	120	1
Denaturacja	94	60	35
Przyłączanie starterów	Temperatura dedykowana dla danej pary starterów	60	
Elongacja	72	60	
Synteza końcowa	72	420	1
Chłodzenie	4	∞	1

4.5. Oczyszczanie produktów reakcji amplifikacji PCR

W celu oczyszczenia produktów reakcji amplifikacji PCR produkty oczyszczono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu odczynników QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen).

4.6. Trawienie restrykcyjne

Trawienia restrykcyjne analizowanych próbek prowadzano z wykorzystaniem enzymów szybkotnących – FastDigest (ThermoScientific) (**Tabela 7.**). Reakcje przeprowadzano wg instrukcji dostarczonej przez producenta, w obecności dedykowanych buforów, w objętości 20 µl bądź 50 µl, w temperaturze 37°C, w czasie 30 lub 60 minut, w zależności od rodzaju eksperymentu (**Tabela 9.**).

4.7. Elektroforeza agarozowa

W celu rozdziału analizowanych fragmentów DNA stosowano standardową elektroforezę agarozową. Rozdział próbek przeprowadzano w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (EtBr, 0,5 µg/ml) w 1 x stężonym buforze TAE (**Tabela 10.**, **Tabela 16.**). Rozdział prowadzono przy napięciu prądu odpowiadającemu 5V na 1 cm długości żelu, w temperaturze pokojowej. Do przygotowanych w żelu studzienek nanoszono próbki DNA połączone uprzednio z buforem obciążającym (**Tabela 11.**). Rozdział analizowanych fragmentów przeprowadzano w obecności markera – GeneRuler™ 1 kb lub GeneRuler™ 100 pz (Thermo Scientific) (**Tabela 17.**), co pozwoliło na określenie ich wielkości po wizualizacji w świetle UV (przy długości fali 320 nm) z wykorzystaniem transiluminatora Benda N36.

4.8. Elucja DNA z żelu agarozowego

Elucję DNA z żelu przeprowadzano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) wg załączonego protokołu.

4.9. Precypitacja DNA

Precypitację analizowanych próbek przeprowadzano w probówkach typu Eppendorf poprzez dodanie do próbek 3 objętości 96% alkoholu etylowego (96% EtOH) oraz 0,1 objętości 5 M octanu potasu (5 M Ack). Próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze -70°C. Po inkubacji próbki wirowano przy prędkości 47000 x g w temperaturze 4°C przez 10 minut. Po wirowaniu delikatnie usuwano supernatant, dodano 500 µl 70% alkoholu etylowego (70% EtOH) i wirowano przy prędkości 47000 x g, w temperaturze 4°C przez 10 minut. Ponownie delikatnie usuwano supernatant,

a osad suszono przez 15 minut w temperaturze 60°C. Po osuszeniu osad zawieszano w 12 µl H_2O.

4.10. Ligacja

Reakcję łączenia fragmentów DNA przeprowadzano z wykorzystaniem ligazy DNA T4 (ThermoScientific) w obecności dedykowanego buforu. Reakcję prowadzono w temperaturze 22°C przez 20 minut bądź w temperaturze 16°C przez noc, w objętości 10 µl lub 20 µl w zależności od rodzaju eksperymentu (**Tabela 8.**, **Tabela 9.**).

4.11. Pomiar stężenia DNA i RNA

Pomiar stężenia DNA i RNA przeprowadzano z wykorzystaniem spektrofotometru DS.-11 FX (DeNovix). Uzyskane wartości podawano w jednostkach ng/µl (**Tabela 20.**).

4.12. Sekwencjonowanie DNA

Poprawność sekwencji DNA na określonych etapach analiz sprawdzano poprzez sekwencjonowanie metodą Sangera, z wykorzystaniem urządzenia Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Analizy zostały wykonane we współpracy z Panią dr Małgorzatą Korycką-Machała w Instytucie Biologii Medycznej PAN.

4.13. Transformacja komórek bakteryjnych

4.13.1. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli*

W celu przeprowadzenia transformacji komórki kompetentne TOP10 *E. coli* poddawano szokowi termicznemu. Próbki umieszczano na lodzie na czas 30 minut, po czym dodawano przygotowaną uprzednio mieszaninę ligacyjną, a następnie całość inkubowano przez 30 minut na lodzie. Po inkubacji komórki poddawano szokowi termicznemu w 42°C przez 2 minuty, po czym umieszczono je na lodzie na czas 5 minut. Następnie komórki zawieszano w 500 µl podłoża LB, i tak przygotowaną hodowlę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C z wytrząsaniem. Bezpośrednio po zakończeniu inkubacji wysiewano 100 µl uzyskanych komórek na podłoże stałe zawierające odpowiednie substancje selekcyjne oraz wirowano komórki przy prędkości 2500 x g przez 1 minutę, zawieszano w 100 µl podłoża LB i wysiewano na szalki zpodłożem stałym. Płytki inkubowano przez 20 – 24 godziny w temperaturze 37°C (**Tabela 14.**).

4.13.2. Transformacja komórek kompetentnych *M. smegmatis*

Do przygotowanych komórek dodawano plazmidowy DNA po uprzednim zliniowaniu (UV Straralinker, Energy – 1000). Następnie mieszaninę przenoszono do schłodzonych kuwet (BioRad, gap – 0,2 cm) i przeprowadzono elektroporację przy napięciu 2,5 kV, oporze 1000 Ω i pojemności elektrycznej 25 µF z wykorzystaniem aparatu do elektroporacji (BioRad Gene Pulser). Po zakończonym procesie mieszaninę dokładnie wymieszano i przeniesiono do probówki typu Falkon zawierającej 5 ml podłoża Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC i inkubowano z wytrząsaniem, w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Po zakończeniu inkubacji wysiewano 100 µl hodowli na podłoże stałe Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC i odpowiednimi czynnikami selekcyjnymi oraz wirowano komórki przy prędkości 4200 x g przez 5 minut, następnie zawieszano w 100 µl podłoża 7H9 i wysiewano na szalki z podłożem stałym. Płytki inkubowano 4 – 6 dni w temperaturze 37°C.

4.14. Konstrukcja wektorów do homologicznej rekombinacji

Przygotowanie wektorów wykorzystanych w procesie rekombinacji homologicznej wymagało kilku etapów. W pierwszym etapie amplifikowano fragment DNA zawierający 5' lub 3' koniec badanego genu wraz z sekwencją flankującą i wprowadzano do plazmidu pJET1.2/blunt (**Tabela 6.**). Klonowane fragmenty DNA analizowano poprzez sekwencjonowanie i przenoszono do plazmidu p2NIL niezdolnego do replikacji w komórkach mykobakterii uzyskując defektywny, badany gen z wewnętrzną delecją otoczony sekwencjami flankującymi. Do tak przygotowanych wektorów wprowadzono kasetę markerową (*aph*, *sacB*, *lacZ*) z wektora pGOAL17 (**Tabela 5.**). W końcowym etapie przygotowane konstrukty genetyczne pKS10, pKS11 i pKS12 noszące odpowiednio geny *Δmsmeg_6236, Δmsmeg_6238, Δ(msmeg_6236/msmeg_6238) wprowadzono* do komórek kompetentnych *M. smegmatis* na drodze elektroporacji, co pozwoliło na selekcję mutantów pojedynczych (SCO – single cross-over) i podwójnych krzyżowych rekombinantów (DCO – double cross-over).

W przypadku szczepu Δ(*mtrA*/*glnR*) do komórek kompetentnych Δ*mtrA* transformowano plazmid pRD152 niosący niefunkcjonalny gen *glnR* i kasetę markerową *sacB* i *lac*Z zawierającą miejsca restrykcyjne PacI (**Tabela 5.**, **Tabela 6.**).

4.15. Mutanty SCO

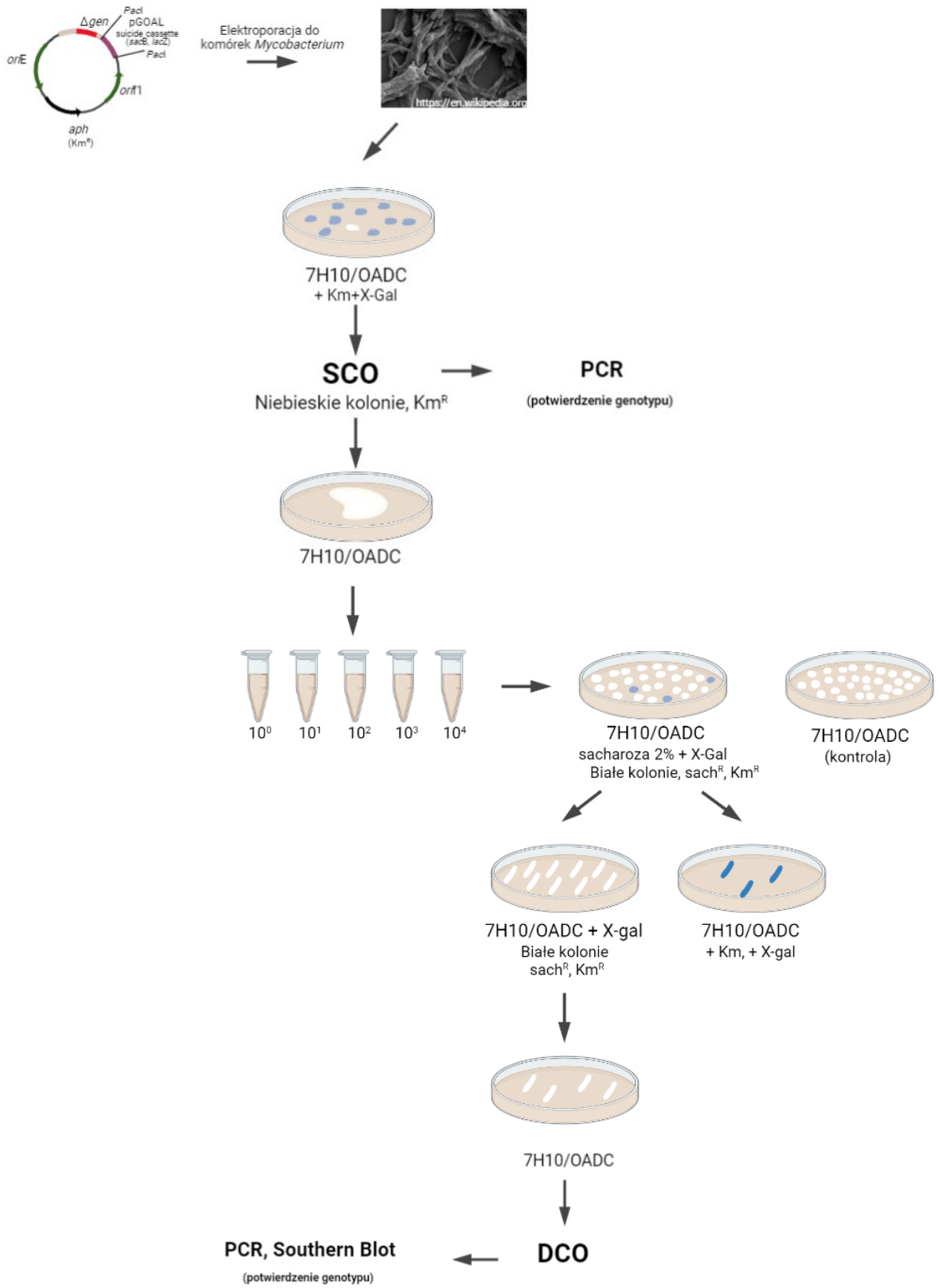
Mutanty SCO (ang. *single cross-over recombinants*) czyli pojedyncze krzyżowe rekombinanty uzyskano na drodze pojedynczej homologicznej rekombinacji poprzez integrację plazmidowego DNA pKS10, pKS11 i pKS12 do chromosomu *M. smegmatis* w sąsiedztwie sekwencji homologicznych. W rezultacie w komórkach prątków doszło do indukcji ekspresji genów wprowadzonych na plazmidzie (*aph*, *sacB*, *lacZ)*, co pozwoliło na selekcję mutantów SCO. W genomie tych mutantów obserwowano występowanie zarówno genów natywnych, funkcjonalnych jak i wprowadzonych na plazmidzie genów zawierających wewnętrzne delecje.

4.16. Mutanty DCO

Mutanty DCO (ang. *double cross-over recombinants*) czyli podwójne krzyżowe rekombinanty uzyskano w wyniku zajścia podwójnej rekombinacji homologicznej. Podczas rekombinacji doszło do utraty plazmidowego DNA oraz obecnych genów markerowych. W genomie tych mutantów obserwowano występowanie natywnej (DCO wild-type) lub niefunkcjonalnej (DCOmut) wersji genu.

4.17. Selekcja mutantów SCO i DCO. Potwierdzenie genotypu mutantów DCO

Selekcję uzyskanych mutantów *M. smegmatis*, zarówno SCO jak i DCO prowadzono poprzez hodowlę na podłożach stałych zawierających określone czynniki selekcyjne X-gal, sacharozę oraz kanamycynę (**Tabela 3.**). Ostatecznie, prawidłowość genotypów uzyskanych mutantów DCO potwierdzano w reakcji PCR oraz z zastosowaniem hybrydyzacji typu Southern blot **(Rycina 3)**.



Rycina 3. Schemat selekcji mutantów SCO i DCO.

4.18. Hybrydyzacja typu Southern blot

Hybrydyzację typu Southern blot prowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu do hybrydyzacji ECL Direct Nucleic Acid Labeling and Detection Systems (GE Healthcare) wg protokołu.

Przygotowanie i przeniesienie DNA na membranę nylonową z zastosowaniem metody kapilarnej

W celu przygotowania materiału do dalszych etapów analiz 2 µg genomowego DNA użyto do trawienia określonymi enzymami, następnie próbki rozdzielano poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym, przez 2 godziny, przy stałym napięciu 80 V. Po rozdziale żel przepłukiwano w następujących roztworach, wg kolejności: roztworem depurynującym (10 minut), denaturującym (2 x po 15 minut), neutralizującym (2 x po 15 minut), przy czym po każdej zmianie buforu żel przepłukiwano w H_2O (**Tabela 13.**).

Tak przygotowany żel umieszczano w układzie składającym się z pojemnika wypełnionego 20-krotnie stężonym buforem SSC, wewnątrz którego została umieszczona szklana płytka, na której powierzchni położono nasączoną 20-krotnie stężonym buforem SSC bibułę filtracyjną (bibuła Whatmana), w taki sposób, że jej końce były zanurzone w buforze znajdującym się w pojemniku. Na powierzchnię bibuły nałożono żel, na którym umieszczone zostały kolejno: nylonowa membrana (nasączona 2-krotnie stężonym buforem SSC) o wielkości odpowiadającej wymiarom żelu, 6 arkuszy bibuły Whatmana (pierwsze 3 nasączone 2-krotnie stężonym buforem SSC, kolejne 3 – suche). Następnie na tak przygotowany układ nakładano ok. 10-centymetrową warstwę ręczników papierowych pełniących funkcję materiału ssącego, dodatkowo obciążonych ciężarem ok. 1 kg. Transfer DNA z żelu na membranę prowadzono w temperaturze pokojowej przez 16 godzin.

Utrwalenie DNA na nylonowej membranie

Po całonocnym transferze membranę płukano w 2-krotnie stężonym buforze SSC, po czym suszono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalano w świetle UV, z wykorzystaniem urządzenia UV Stratalinker 1800 (program: auto cross link - 1200 µJ x 100).

Znakowanie sondy

Znakowanie sondy polegało na kowalencyjnym wiązaniu DNA z termostabilną alkaliczną fosfatazą, w obecności aldehydu glutarowego wykazującego właściwości sieciujące. Wcześniej przygotowaną sondę (w reakcji amplifikacji PCR) rozcieńczono doprowadzając do stężenia 10 ng/µl po czym inkubowano we wrzącej łaźni wodnej (5 minut). Następnie każdą próbkę poddawano schłodzeniu na lodzie (5 minut) po czym dodawano do niej 10 µl buforu reakcyjnego, 2 µl odczynnika znakującego i 10 µl aldehydu glutarowego. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut.

Prehybrydyzacja i hybrydyzacja

Kolejne etapy hybrydyzacji zostały przeprowadzone w tubie hybrydyzacyjnej w ogrzanym do temperatury 55°C buforze hybrydyzacyjnym (0,125 ml/cm^2 membrany), w którym zanurzono membranę. Następnie tubę umieszczano w piecu hybrydyzacyjnym ogrzanym do temperatury 55°C, a po upływie 1 godziny do buforu dodawano wyznakowaną sondę i prowadzono hybrydyzację przez 12 godzin w temperaturze 55°C.

Po 12 godzinnej inkubacji membranę przepłukiwano buforem przemywającym I (2 x po 10 minut), ogrzanym do temperatury 55°C. W dalszej kolejności membranę przepłukiwano buforem przemywającym II (2 x po 5 minut). Pozostałości buforu usuwano poprzez delikatnie odsączenie membrany, po czym nanoszono na nią równomiernie odczynnik do detekcji (40 µl/cm^2) i prowadzono 5 minutową inkubację w temperaturze pokojowej. Następnie membranę odsączano delikatnie z nadmiaru odczynnika, umieszczano w foliowym, przeźroczystym opakowaniu i umieszczono w kasecie rentgenowskiej. W ciemni, na kasetę nakładano kliszę rentgenowską, inkubowano 1 godzinę, po czym kliszę wywołano w automatycznym systemie Medical X-ray Processor (Kodak).

4.19. Komplementacja mutantów typu DCO z wykorzystaniem wektorów integracyjnych

W celu konstrukcji wektorów integracyjnych przeprowadzono reakcję amplifikacji PCR genów *msmeg_6236*, *msmeg_6238* oraz *msmeg_6236/6238* na matrycy chromosomalnego DNA mc^2 155 *M. smegmatis* z wykorzystaniem polimerazy AccuPrime Pfx (**Tabela 6.**). Otrzymane w wyniku ligacji z wektorem pJET1.2/blunt geny wklonowano niezależnie do wektora integracyjnego pJAM2 (**Tabela 5.**). W kolejnym etapie geny te

zostały przeklonowane do wektora integracyjnego pMV306 niosącego kasetę oporności na kanamycynę.

4.20. Ocena wzrostu szczepów *M. smegmatis* w podłożu płynnym z dodatkiem związków azotowych lub węglowych stanowiących jedyne źródło azotu lub węgla

Hodowle szczepu dzikiego oraz mutantów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80 (podłoże bogate) w objętości 100 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Po nocnej inkubacji hodowle wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g, następnie usuwano supernatant zawieszając osad w 50 ml podłoża 7H9 lub Sauton pozbawionego źródeł azotu bądź węgla (**Tabela 2.**), w zależności od prowadzonego eksperymentu i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g. Czynność tę powtarzano dwukrotnie, zawieszając osad odpowiednio w 30 ml i 10 ml podłoża. Następnie zakładano hodowle szczepu dzikiego i mutantów w objętości 20 ml, na podłożu 7H9 lub Sauton pozbawionym źródeł azotu bądź węgla, doprowadzając gęstość optyczną hodowli do wartości OD_{600}=0,1 lub OD_{600}=0,5 w przypadku eksperymentu dotyczącego oceny wzrostu szczepu kontrolnego i szczepów mutantów na podłożu stałym YNB bez dodatku oraz z dodatkiem azotanu sodu w stężeniu 10 mM. Do każdej z hodowli dodawano określony związek azotu lub węgla, w zależności od prowadzonego eksperymentu, w określonym stężeniu (1 mM, 5 mM, 10 mM, 30 mM w przypadku związków azotowych oraz 0,02%, 0,05%, 0,25%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3% stężenia końcowego (v/v) w przypadku związków węglowych. W przypadku doświadczenia dotyczącego analizy wzrostu szczepów na podłożu YNB nanoszono po 10 µl hodowli o OD_{600}=0,5 i rozprowadzano ezą. Układy kontrolne stanowiły hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80, w podłożu Sauton pozbawionym źródeł azotu bądź węgla, lub w przypadku oceny wzrostu analizowanych szczepów na podłożu YNB z dodatkiem azotanu sodu podłoże Middlebrook 7H10 oraz podłoże YNB pozbawione źródeł azotu. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem lub bez, i w zależności od rodzaju eksperymentu dokonywano pomiarów OD_{600} w 6, 9, 12, 24, 36 i 48 godzinie od momentu założenia eksperymentu, każdorazowo pobierając po 1 ml hodowli. Każdy z eksperymentów prowadzono w trzech, niezależnych powtórzeniach. Dla uzyskanych danych wyznaczono krzywe wzrostowe w programie Microsoft Excel.

4.21. Ocena wzrostu szczepów *M. smegmatis* w podłożu płynnym z dodatkiem związków węglowych stanowiących jedyne źródło węgla z etapem głodzenia wstępnego

W przypadku części eksperymentów przed doświadczeniem właściwym wprowadzony został dodatkowy etap głodzenia wstępnego. W eksperymentach tych hodowle szczepu dzikiego oraz mutantów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC i Tweenu 80 w objętości 100 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Po nocnej inkubacji hodowle wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g, następnie usuwano supernatant zawieszając osad w 50 ml podłoża 7H9 i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g. Czynność tę powtarzano dwukrotnie, zawieszając osad odpowiednio w 30 ml i 10 ml podłoża. Następnie zakładano hodowle szczepu dzikiego i mutantów na podłożu 7H9 z dodatkiem 0,1% glukozy i 0,015% tyloksapolu, doprowadzając gęstość optyczną hodowli do wartości OD_{600}=0,3. Hodowle prowadzono przez noc, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Po inkubacji nocnej hodowle wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g i zawieszano w 10 ml podłoża 7H9. Następnie zakładano hodowle szczepu dzikiego i mutantów w objętości 20 ml, na podłożu 7H9 z dodatkiem 0,1% glukozy i 0,015% tylokspolu. Do każdej z hodowli dodawano określony związek węgla, w określonym stężeniu (5 mM, 10 mM, 0,02%, 0,05%, 0,25%, 0,1%, 0,2%, 1% lub 2% stężenia końcowego (v/v)). Układy kontrolne stanowiły hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, i w zależności od rodzaju eksperymentu dokonywano pomiarów OD_{600} w 6, 9, 12, 24, 36 i 48 godzinie od momentu założenia eksperymentu, każdorazowo pobierając po 1 ml hodowli. Każdy z eksperymentów prowadzono w trzech, niezależnych powtórzeniach. Dla uzyskanych danych wyznaczono krzywe wzrostowe w programie Microsoft Excel.

W przypadku wybranych eksperymentów wzrost komórek szczepu dzikiego i analizowanych mutantów określano poprzez oznaczenie liczby żywych komórek (CFU – ang. *colony forming unit*). W tym celu pobierano 1 ml hodowli, wykonywano szereg rozcieńczeń i wysiewano po 100 µl na podłoże stałe Middlebrook 7H10 z dodatkiem OADC i Tween 80. Następnie płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez okres 72 godzin.

4.22. Globalna analiza transkryptomu (RNA-seq)

4.22.1. Indukcja głodzenia węglowego

Hodowle szczepu dzikiego oraz mutanta Δ(*msmeg_6236-msmeg_6238*) prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem tyloksapolu w stężeniu końcowym 0,015% (v/v) oraz glukozy w stężeniu końcowym 2%, w objętości 100 ml, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Po osiągnięciu współczynnika gęstości optycznej OD_{600} w zakresie 0,6 – 0,8 hodowle wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3900 x g, następnie usuwano supernatant zawieszając osad w 50 ml podłoża Middlebrook 7H9 i wirowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, przy prędkości 3 900 x g. Czynność tę powtarzano dwukrotnie, zawieszając osad odpowiednio w 30 ml i 10 ml podłoża. W kolejnym etapie eksperymentu uzyskaną zawiesiną bakteryjną zaszczepiano 60 ml podłoża Middlebrook 7H9 z dodatkiem tyloksapolu, doprowadzając gęstość optyczną hodowli do wartości OD_{600}=0,1. Doświadczenie prowadzono w trzech, różnych wariantach eksperymentalnych. W układzie pierwszym – kontrolnym, bez głodzenia węglowego do hodowli dodawano glukozę w stężeniu końcowym 2% (v/v), w układzie drugim glukozę w stężeniu końcowym 0,1% (v/v) - warunki głodzenia węglowego, w wariancie trzecim do hodowli dodawano glukozę w stężeniu końcowym 0,1% (v/v) oraz 1,3-propanadiol, którego stężenie końcowe w hodowli wynosiło 2% (v/v). Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, dokonując pomiarów OD_{600} w 9, 12, 15, 18 i 24 godzinie od momentu założenia eksperymentu, aż do zahamowania wzrostu bakterii, po czym dodano 1,3-propanadiol i prowadzono hodowle przez kolejne 16 godzin. Wszystkie hodowle wirowano, a uzyskany osad komórkowy przechowywano w temperaturze -80°C.

4.22.2. Indukcja głodu azotowego

W pierwszym etapie eksperymentu hodowle szczepu dzikiego oraz mutantów: Δ*mtrA* oraz Δ*glnR* prowadzono wg procedury zastosowanej dla indukcji głodu węglowego (**Metody 4.22.1**). Doświadczenie prowadzono w dwóch, różnych wariantach eksperymentalnych. W układzie kontrolnym – do hodowli prowadzonej w podłożu Sauton pozbawionym źródła azotu (**Tabela 2.**) dodawano siarczan amonu w stężeniu końcowym 30 mM, w układzie badawczym – w stężeniu końcowym wynoszącym 1 mM. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem, dokonując pomiarów zawartości jonów amonowych w hodowlach za pomocą zestawu Ammonium Test (Merck), zgodnie

z protokołem producenta, w określonych punktach czasowych: 9, 12, 15, 18 i 24 godzinie od momentu założenia eksperymentu, aż do całkowitego wykorzystania tego związku. Po dodatkowych 2 godzinach od całkowitego wyczerpania się jonów amonowych, wszystkie hodowle wirowano, a uzyskany osad komórkowy przechowywano w temperaturze -80°C.

4.22.3. Izolacja RNA z komórek *M. smegmatis*

Izolację RNA z komórek *M. smegmatis* prowadzono z zastosowaniem odczynnika TRIzol. Uzyskane osady komórkowe zawieszano w 300 µl wody DEPC, po czym przenoszono je do nowych probówek typu Eppendorf dodając do całości zawiesiny 900 µl odczynnika TRIzol (w stosunku 1:3). Następnie mieszaninę przenoszono do wypełnionych krzemionkowymi kulkami homogenizacyjnymi probówek Lysing Matrix (MP Biomedicals) i umieszczano je na lodzie. W kolejnym etapie przeprowadzano dwukrotną homogenizację analizowanych próbek z wykorzystaniem urządzenia FastPrep®-24 wg schematu: 45 sekundowa homogenizacja (6 m/s), inkubacja na lodzie, 45 sekundowa homogenizacja, 3-4 minutowa inkubacja na lodzie. Po zakończeniu procesu homogenizacji próbki umieszczano na lodzie, a po ich schłodzeniu i osadzeniu na dnie probówki kulek homogenizacyjnych pobrany lizat (supernatant) przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i wirowano w temperaturze 4°, przez 7 minut, przy prędkości 12000 x g. Po wirowaniu supernatant przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf, po czym próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po zakończonej inkubacji do mieszaniny dodawano 250 µl chloroformu, dokładnie mieszano w czasie 2 minut i inkubowano na lodzie w czasie 10 minut. Po zakończonej inkubacji próbki wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut, przy prędkości 12000 x g. W kolejnym etapie uzyskany supernatant w formie fazy wodnej (2/3 objętości górnej warstwy) przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf i poddano precypitacji z wykorzystaniem: 1 objętości izopropanolu, 1/10 objętości 3M octanu sodu oraz 1 µl związku GlycoBlue (Invitrogen). Tak przygotowaną mieszaninę umieszczono na noc w temperaturze -20°C. Następnego dnia próbki wirowano w temperaturze 4°C, w czasie 30 minut (20000 x g). Po usunięciu supernatantu osad przemywano 500 µl schłodzonego, 70% etanolu. Następnie próbki wirowano w temperaturze 4°C, w czasie 30 minut (20000 x g), a pozostały po usunięciu supernatantu osad suszono w temperaturze pokojowej, w ciągu około 15 minut. Po wysuszeniu osad rozpuszczano w 40 µl wody DEPC i określano stężenie powstałej

mieszaniny RNA i DNA („brudny” RNA) z wykorzystaniem spektrofotometru DS-11 FX (DeNovix).

W celu eliminacji zanieczyszczeń DNA z uzyskanych próbek RNA, próbki te (w stężeniu 10 µg) poddano trawieniu DNazą zgodnie z protokołem zawartym w komercyjnym zestawie TURBO DNA-*free*™ Kit (Ambion) oraz określano ich stężenie z wykorzystaniem spektrofotometru DS-11 FX (DeNovix) (**Tabela 8.**).

W celu określenia możliwości wykorzystania preparatów RNA do dalszych analiz, sprawdzono uzyskany poziom integralności próbek wg instrukcji załączonej do zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) z wykorzystaniem urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Dalsze analizy zostały przeprowadzone dla próbek, których wartość poziomu integralności RNA była wyższa od 7.

4.22.4. Rybodeplecja - Usunięcie rRNA

Preparaty RNA spełniające kryteria jakościowe poddano dalszej analizie. W tym celu uzyskane próbki oczyszczano z wykorzystaniem magnetycznych kulek AMPure XP (Beckman Coulter) przenosząc preparaty RNA do probówek typu Eppendorf i mieszając je z kulkami w stosunku 1:2. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po inkubacji supernatant dwukrotnie usuwano z wykorzystaniem separatora magnetycznego, a osad inkubowano z 200 µl 70% etanolu przez 30 sekund. Po zakończeniu ostatniego cyklu próbki inkubowano w temperaturze pokojowej do momentu całkowitego wyschnięcia preparatów, po czym zawieszano je w 13,5 µl wody DEPC, inkubowano w temperaturze pokojowej w czasie 2 minut i rozdzielano z wykorzystaniem separatora. Supernatant zawierający oczyszczone RNA został przeniesiony do nowej probówki typu Eppendorf, po czym przeprowadzono proces usuwania rRNA z preparatów wg protokołu dołączonego do komercyjnego zestawu Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina).

4.22.5. Przygotowanie bibliotek do analizy RNA-seq

Uzyskane podczas wcześniejszych etapów preparaty RNA wykorzystano do przygotowania bibliotek RNA. Konstrukcja bibliotek została przeprowadzona według protokołu dołączonego do komercyjnego zestawu KAPA Stranded RNA-seq Library

Preparation Kit (KAPA BIOSYSTEMS), który obejmował etap: fragmentacji RNA, syntezy cDNA, syntezy drugiej nici, naprawy i adenylacji końców DNA, ligacji adapterów i amplifikacji bibliotek. Do uzyskanych bibliotek przypisano indeksy, umożliwiające ich późniejszą identyfikację. Dalsza analiza obejmująca określenie jakościowych i ilościowych parametrów bibliotek została przeprowadzona z zastosowaniem zestawu odczynników Agilent DNA 1000 Kit (Agilent) dedykowanych dla urządzenia Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) (**Tabela 18.**). Powyższe analizy wykonano we współpracy z mgr Eweliną Lechowicz z Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* PAN.

4.22.6. Sekwencjonowanie bibliotek

Uzyskane biblioteki poddano sekwencjonowaniu na urządzeniu NextSeq 500 (Illumina). Sekwencjonowanie to zostało przeprowadzone we współpracy z dr Dominikiem Strapagielem w Pracowni Biobank, Katedry Biofizyki Molekularnej UŁ.

Biblioteki RNA-seq sekwencjonowano przy użyciu systemu NextSeq 500 System (Illumina i zestawu NextSeq 500/550 Mid Output v2 Sequencing Kit (150 cykli) (Illumina), gwarantując w ten sposób od 5 do 10 milionów odczytów sparowanych końców na próbkę. Izolacja RNA, utworzone biblioteki i sekwencjonowanie RNA przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

Analiza danych sekwencjonowania RNA została przetworzona za pomocą szeregu skryptów oprogramowania (Płociński i wsp., 2019). Adaptery sekwencjonowania usunięto za pomocą Cutadapt v.1.9.1 (Martin i wsp., 2011), a odczyty zostały jakościowo przycięte za pomocą skryptu Sickle przy parametrach zachowania minimalnej jakości na poziomie 30% i minimalnej długości odczytu 20 pz. Przefiltrowane odczyty zostały następnie dopasowane do genomu *M. smegmatis* mc^2 155 przy użyciu Bowtie 2 identyfikującego krótkie sparowania (Langmead i wsp., 2012). Konwersja i indeksowanie zostały wykonane przez pakiet oprogramowania SAMtools (Li i wsp., 2009). Ekspresję różnicową oszacowano za pomocą internetowej platformy analitycznej Degust RNA-seq z domyślnymi parametrami (http://degust.erc.monash.edu) (Powell, 2019). Ekspresję genów uznano za inną, jeśli wartość fałszywego odkrycia (FDER) wynosiła <0,05, a log2-krotna zmiana była większa niż wartość bezwzględna 2 (zmiana czterokrotna lub więcej).

Analizy bioinformatyczne zostały wykonane we współpracy z dr Przemysławem Płocińskim z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, z wykorzystaniem programów lub internetowych platform, umożliwiających analizę uzyskanych danych: Mycobrowser (https://mycobrowser.epfl.ch/), iDEP.96 (https://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/), Degust (https://degust.erc.monash.edu/), KEGG (https://www.genome.jp/kegg/), iPath$_3$ (https://pathways.embl.de/) i Genome (https://www.genome.jp/).

4.22.7. qRT-PCR

W celu weryfikacji danych uzyskanych w wyniku analizy transkryptomu przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem metody qRT-PCR (ang. *real-time quantitative reverse transcription PCR*). Etap pierwszy obejmował przeprowadzenie syntezy cDNA na matrycy RNA z wykorzystaniem zestawu do odwrotnej transkrypcji – SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix kit (Invitrogen). Do reakcji użyto 1 µg „czystego" RNA, losowe heksanukleotydy starterowe, bufor oraz wodę DEPC. Objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl (**Tabela 9.**). Mieszanina ta została poddana 5 minutowej inkubacji w temperaturze 65°C, a następnie schłodzona do temperatury 4°C. Do próbki dodawano 10 µl 2x stężonego odczynnika First-Strand Reaction Mix oraz 2 µl odczynnika SuperSpriptIII/RNase OUT Enzyme Mix. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano: w temperaturze 25°C przez 10 minut, w temperaturze 55°C przez 50 minut, w temperaturze 85°C przez 5 minut, po czym schładzano do temperatury 4°C i przechowywano w temperaturze -20°C.

Podczas drugiego etapu eksperymentu przeprowadzono analizę qRT-PCR w wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) na urządzenia QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System. Skład przygotowanej mieszaniny reakcyjnej o objętości 10 µl zawierał: 50 ng cDNA, 1x stężony PowerUp™SYBR™Green Master Mix [2x] oraz po 10 µM każdego z dwóch oligonukleotydów (**Tabela 9.**). Reakcja była prowadzona w kilku, następujących po sobie etapach: aktywacji początkowej (w temperaturze 50°C przez 5 minut), denaturacji wstępnej (w temperaturze 95°C przez 2 minuty), powtarzanych 40-krotnie cyklach: denaturacji właściwej (w temperaturze 95°C przez 15 sekund), przyłączanie oligonukleotydów (w temperaturze 65°C przez 15 sekund), wydłużania starterów (w temperaturze 72°C przez 1 minutę). Reakcja prowadzona była w trzech, niezależnych powtórzeniach. Po zakończonej reakcji

wyznaczono krzywą topnienia – Melt Curve Plot, mającą na celu sprawdzenie jednorodności uzyskanych produktów reakcji. Próbę odniesienia dla ustalenia poziomu ekspresji badanych genów stanowił poziom ekspresji genu *sigA* kodującego podjednostkę polimerazy RNA u *Mycobacterium*, a uzyskane analizowanych genów wyniki były porównywane z poziomem ekspresji tych samych genów w szczepie dzikim.

Końcowa analiza wyników była przeprowadzona z wykorzystaniem metody komparatywnej (Tyburski i wsp., 2008) co pozwoliło na porównanie różnic w poziomie ekspresji analizowanych genów oraz szczepu dzikiego. Poziom ekspresji analizowanego transkryptu zestawiono z poziomem ekspresji genu wzorcowego *sigA*. Podczas dalszej analizy wyznaczono cykle progowe (C_t – ang. *copy treshhold*) dla wszystkich badanych genów, w tym szczepów dzikiego i referencyjnego, co pozwoliło na wyznaczenie różnic pomiędzy tymi genami. W tym celu skorzystano ze wzorów:

ΔC_t szczepu badanego = C_t analizowanego genu - C_t wzorcowego genu

ΔC_t szczepu dzikiego = C_t analizowanego genu - C_t wzorcowego genu

W kolejnym etapie wyznaczono wartość podwójnej delty ($\Delta\Delta C_t$) dla wszystkich analizowanych szczepów. W tym celu korzystano ze wzoru:

$\Delta\Delta C_t$ szczepu badanego = C_t badanego szczepu - C_t dzikiego szczepu

Końcowy etap analizy obejmował wyznaczenie względnego poziomu ekspresji analizowanych genów w odniesieniu do genu dzikiego. W tym celu skorzystano ze wzoru:

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

Jeśli:

R = 1 – równy, jednakowy poziom ekspresji genu w szczepie badanym i dzikim

R < od wartości jedności – poziom ekspresji genu w szczepie dzikim jest wyższy niż w szczepie badanym

R > od wartości jedności – poziom ekspresji genu w szczepie dzikim jest niższy niż w szczepie badanym.

4.23. Konstrukcja wektora do nadekspresji rekombinowanego białka MtrA

Konstrukcje wektora do nadekspresji białka MtrA rozpoczęto od amplifikacji sekwencji genu *mtrA* na matrycy chromosomalnego DNA *M. smegmatis* z użyciem reakcji PCR. Następnie uzyskany produkt PCR został klonowany do wektora pJET1.2 i zsekwencjonowany. W kolejnym etapie gen *mtrA* przeklonowano do wektora ekspresyjnego pHis, ułatwiającego oczyszczanie białka poprzez fuzję ze znacznikiem His (6xHis). Uzyskany konstrukt genetyczny pK22 transformowano do komórek BL21 (DE3) (**Tabela 6.**).

4.24. Nadprodukcja i oczyszczanie rekombinowanego białka MtrA

Warunki niezbędne do przeprowadzenia nadprodukcji białka MtrA w szczepie BL21 (DE3) dotyczące ustalenia odpowiedniej temperatury oraz czasu prowadzenia hodowli zostały ustalone eksperymentalnie, z wykorzystaniem hodowli prowadzonych na małą skalę (objętość 20 ml). Izolację białek na dużą skalę prowadzono z osadu komórek pochodzącego z hodowli o objętości 1000 ml.

Nadprodukcję białka MtrA prowadzono w zmodyfikowanym podłożu laktozowym LB z dodatkiem ampicyliny. Hodowle (o łącznej objętości 1L) zaszczepiano w stosunku 1:100 i prowadzono w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem do momentu uzyskania wartości współczynnika gęstości optycznej OD=0,6-0.8. Następnie hodowle schładzano do temperatury 20°C i inkubowano przez noc z wytrząsaniem. Po inkubacji nocnej hodowle wirowano w temperaturze 4°C, przez 20 minut, przy prędkości 3900 x g, następnie usuwano supernatant, a osady przechowywano w temperaturze -70°C.

Rekombinowane białko MtrA oczyszczano z zastosowaniem metody chromatografii powinowactwa poprzez wykorzystanie złoża niklowego HisPur Ni-NTA (ThermoFisher Scientific). Pierwszy etap oczyszczania rekombinowanych białek rozpoczęto od rozmrożenia zamrożonych osadów i ich zawieszenia w 10 ml buforu wiążącego A1 (**Tabela 12.**). Tak przygotowaną zawiesinę inkubowano poprzez 30 minut na kołysce laboratoryjnej. Na 5 minut przed końcem inkubacji do próbek dodawano DNAzę (DENARASE®) w stężeniu 100 kU/1 µl. Po zakończonej inkubacji próbki poddawano sonikacji z wykorzystaniem sondy ultradźwiękowej (Bioblok) i stopniowanej mikrokońcówki (LaboPlus) w dziesięciu, 10 sekundowych cyklach. Po zakończonej sonikacji próbki wirowano w temperaturze 4°C,

przez 60 minut, przy prędkości 7800 x g, a uzyskany supernatant filtrowano (z wykorzystaniem filtra strzykawkowego o średnicy porów 0,45 µm) i inkubowano w 4°C przez 1 godzinę ze złożem. W kolejnym etapie supernatant przenoszono na uprzednio skalibrowaną kolumnę buforem wiążącym A1 (25 ml). Podczas stopniowego przepuszczania supernatantu przez kolumnę, zbierano frakcje białek niezwiązanych ze złożem. Następnie kolumnę przepłukiwano 100 ml buforu płuczącego A2 (**Tabela 12.**). W kolejnym etapie analizowane białka związane ze złożem eluowano z wykorzystaniem 10 ml buforu do elucji, jednocześnie zbierając do probówek typu Eppendorf dziesięć frakcji o objętości 1 ml (**Tabela 12.**). Czystość rekombinowanego białka w poszczególnych frakcjach oraz wydajność etapu oczyszczania sprawdzano z wykorzystaniem elektroforezy pionowej SDS-PAGE.

4.25. Wymiana buforu oraz zatężanie białka MtrA

Wymianę buforu białka przeprowadzono w celu usunięcia imidazolu, będącego składnikiem buforu do elucji. W celu wymiany buforu, na skalibrowaną 25 ml buforu do wymiany kolumnę PD-10 Columns – GE Healtcare nakładano jednorazowo maksymalnie 2,5 ml frakcji białka (zbierano przesącz), które następnie eluowano buforem do wymiany w objętości 3,5 ml.

Zatężanie uzyskanego białka przeprowadzono z wykorzystaniem koncentratora do białek Vivaspin®6 /10kDa MWCO/ (GE Healtcare), zgodnie z protokołem producenta.

4.26. Oznaczanie stężenia białek

Pomiar stężenia białka przeprowadzano z użyciem odczynnika Bradford Reagent (BioShop), w urządzeniu DeNovix (ThermoFisher Scientific). Do pomiaru absorbancji przy długości fali 595 nm (w odniesieniu do próby kontrolnej, którą stanowił 1 ml odczynnika Bradford Reagent) użyto mieszaniny 10 µl zatężonego białka i 1 ml odczynnika Bradford Reagent. Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej przeprowadzono pomiar stężenia białek w mg/ml.

4.27. Elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach denaturujących

Rozdział analizowanych białek w oparciu o różnice w ich masie cząsteczkowej przeprowadzono z wykorzystaniem jednokierunkowej elektroforezy pionowej w żelu

poliakrylamidowym (SDS-PAGE) (**Tabela 16.**). Do analizowanych próbek białkowych dodawano 5 µl 4x stężonego buforu do obciążania, po czym próbki te poddawano 5 minutowej denaturacji w temperaturze 98°C (**Tabela 11.**). W następnej kolejności próbki nakładano na żel poliakrylamidowy w obecności markera wielkości białek i prowadzono rozdział elektroforetyczny w buforze TGB (temperatura pokojowa, napięcie prądu 140 V) (**Tabela 10.**, **Tabela 17.**). Rozdział zakończono w momencie usunięcia barwnika z żelu, po czym żel płukano w wodzie destylowanej i barwiono z wykorzystaniem barwnika do żeli białkowych Instant Blue (Expedeon).

4.28. EMSA (ang. Electrophoretic Mobility Shift Assay)

W celu określenia oddziaływania analizowanych białek z DNA przeprowadzono analizę z wykorzystaniem metody EMSA, opartą na elektroforetycznym rozdziale kompleksów białek z DNA (kompleksy białek i DNA wędrują wolniej niż niezwiązany DNA). Do przeprowadzenia analizy wykorzystano znakowane cysteiną 5 (Cy5) fragmenty DNA amplifikowane z użyciem specyficznych starterów (**Materiały 3.4.**, **Tabela 4**). Następnie przeprowadzono reakcję annealingu starterów znakowanych i nieznakowanych, w stężeniu 100 µM każdy. Skład przykładowej mieszaniny reakcyjnej został opisany w rozdziale **Materiały 3.7** (**Tabela 9**.). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w żelu agarozowym 1% w 0,5x stężonym buforze TBE, w temperaturze 4°C, przy napięciu 70V, przez 2,5 godziny. (**Tabela 16.**). Wizualizację uzyskanych kompleksów przeprowadzono z wykorzystaniem urządzenia Azure400 (Azure Biosystems).

4.29. Analiza wrażliwości szczepów M. smegmatis na wybrane antybiotyki metodą Microplate Alamar Blue Assay

Metoda oceny wrażliwości szczepów *M. smegmatis* z wykorzystaniem Microplate Alamar Blue Assay opiera się na zdolności żywych komórek prątków do redukcji barwnika tj. rezazuryny do rezorufiny (zmiana zabarwienia z niebieskiego na różowe, reakcja kolorymetryczna). Hodowle szczepu dzikiego i analizowanych mutantów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80, przez noc, w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Po nocnej inkubacji hodowle rozcieńczano z wykorzystaniem podłoża 7H9 doprowadzając je do stężenia 0,5 w skali MacFarlanda, po czym rozcieńczano je dwukrotnie po 10 razy. Uzyskaną w ten sposób zawiesinę rozpipetowywano po 100 µl na

płytkę titracyjną 96-studzienkową. Na płytkę nakładano również po 100 µl podłoża 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80 oraz wybrane antybiotyki w określonych stężeniach. Na płytkach zawarto również układy kontrolne: hodowle szczepów, badany antybiotyk w najwyższym stężeniu, użyte podłoże. Analizowane płytki inkubowano w temperaturze 37°C, przez 2 dni następnie do każdego z dołków dodawano po 25 µl 0,02% rezazuryny, dokładając kontrolną studzienkę wypełnioną wykorzystaną w doświadczeniu rezazuryną i inkubowano 24 godziny, w temperaturze 37°C, w ciemności. Po zakończonej inkubacji płytkę poddawano analizie z wykorzystaniem czytnika Tecan INFINITE M PLEX (TK Biotech).

4.30. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Statistica ver. 13.3.

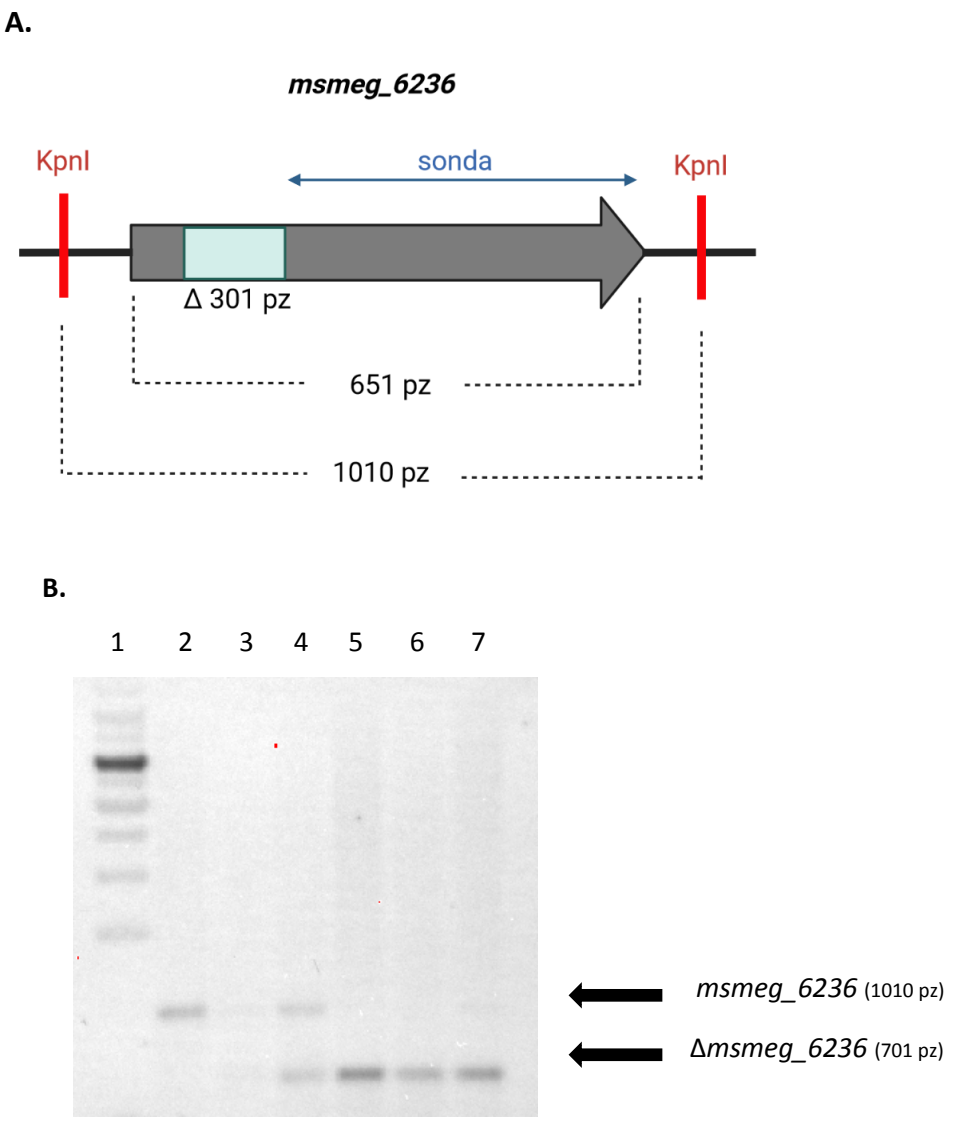
5. Wyniki

5.1. Znaczenie białek systemu dwukomponentowego MnoS-MnoR dla wzrostu komórek *M. smegmatis*

W celu zbadania znaczenia białek MnoS (MSMEG_6238) oraz MnoR (MSMEG_6236) dla wzrostu komórek *M. smegmatis* przeprowadzono konstrukcję i analizę szczepów mutantów pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_6236* i *msmeg_6238*.

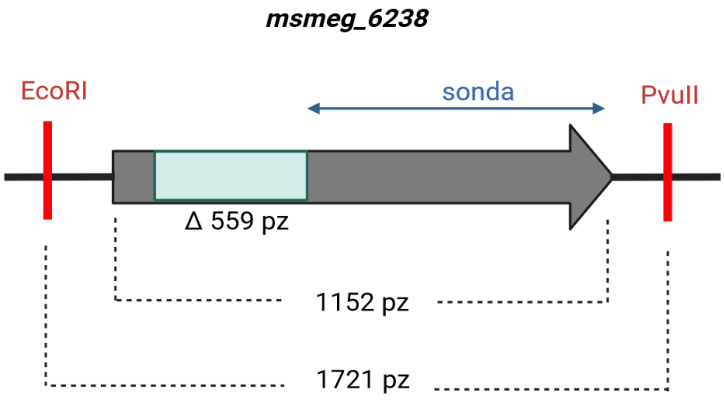
5.1.1.Konstrukcja ukierunkowanych mutantów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_6236/msmeg_6238*

Mutanty *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych genów *msmeg_6236/msmeg_6238* uzyskano wykorzystując zjawisko homologicznej rekombinacji po wprowadzeniu do szczepu *M. smegmatis* mc^2 155 plazmidów samobójczych, noszących niefunkcjonalne kopie genów otoczone sekwencjami flankującymi. Selekcja pojedynczych i podwójnych rekombinantów została przeprowadzona w oparciu o obecność genów markerowych w obrębie rekombinowanego plazmidu p2NIL/pGOAL19 (**Materiały 3.5.**). Zarówno na etapie selekcji pojedynczych (SCO) jak i podwójnych (DCO) rekombinantów genotypy wybranych mutantów weryfikowano poprzez reakcję amplifikacji oraz hybrydyzacji typu Southern blot. Pozwoliło to na identyfikacje nieoznaczonych (unmarked) mutantów DCO pozbawionych funkcjonalnych genów Δ*msmeg_6236,* Δ*msmeg_6238,* oraz obu tych genów równocześnie. Chromosomalny DNA izolowany z wybranych mutantów oraz szczepu kontrolnego poddawano trawieniu odpowiednią endonukleazą (*msmeg_6236* – KpnI, Δ*msmeg_6238* – EcoRI/PvuII i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – KpnI/EcoRI), rozdzielano w żelach agarozowych, a następnie po przeniesieniu na membranę nylonową hybrydyzowano z sondą genetyczną stanowiącą 3' fragment badanych genów. Przeprowadzone analizy potwierdziły genotypy uzyskanych mutantów DCO: Δ*msmeg_6236* (**Rycina 4B.**), Δ*msmeg_6238* (**Rycina 5B.**) i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) (**Rycina 6B.**).

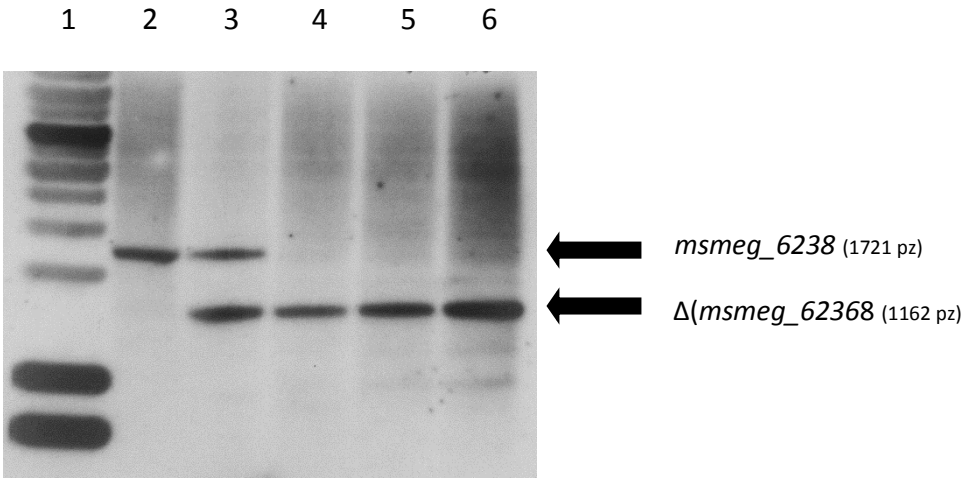


Rycina 4. Analiza genotypu mutanta Δ*msmeg_6236* metodą hybrydyzacji Southern blot. **(A)** Schemat *locus* genu *msmeg_6236* z zaznaczeniem miejsc rozpoznawanych przez enzym KpnI, sondy genetycznej oraz wewnętrznej delecji. **(B)** Wynik hybrydyzacji typu Southern blot na matrycy chromosomalnego DNA analizowanych szczepów. 1 – marker wielkości (1kb), 2 – szczep kontrolny *M. smegmatis* mc^2 155, 3-4 – mutant typu SCO (*msmeg_6236*-Δ*msmeg_6236*), 5-7 – mutant typu DCO (Δ*msmeg_6236*).

A.

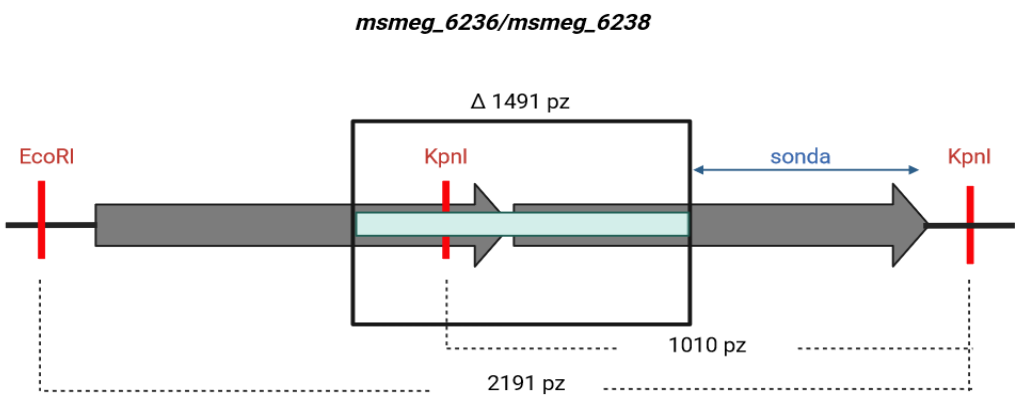


B.

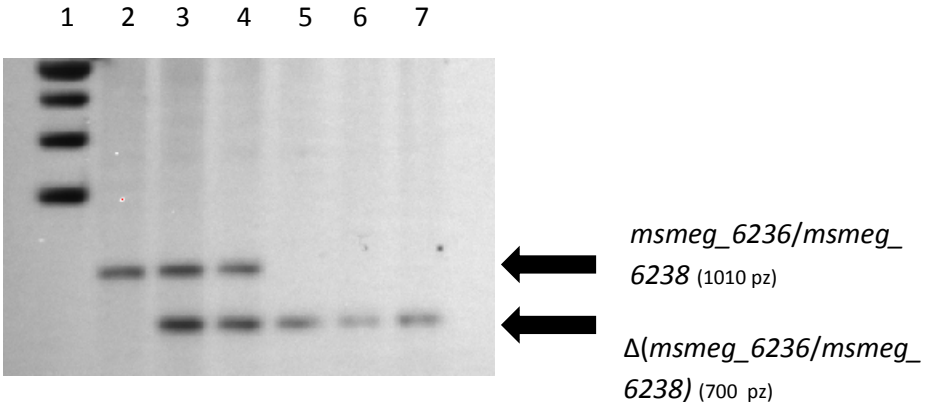


Rycina 5. Analiza genotypu mutanta Δ*msmeg_6238* metodą hybrydyzacji Southern blot. **(A)** Schemat *locus* genu *msmeg_6238* z zaznaczeniem miejsc rozpoznawanych przez enzymy EcoRI/PvuII, sondy genetycznej oraz wewnętrznej delecji. **(B)** Wynik hybrydyzacji typu Southern blot na matrycy chromosomalnego DNA analizowanych szczepów. 1 – marker wielkości (1kb), 2 – szczep kontrolny *M. smegmatis* mc^2 155, 3 – mutant typu SCO (*msmeg_6238*-Δ*msmeg_6238*), 4-6 – mutant typu DCO (Δ*msmeg_6238*).

A.



B.



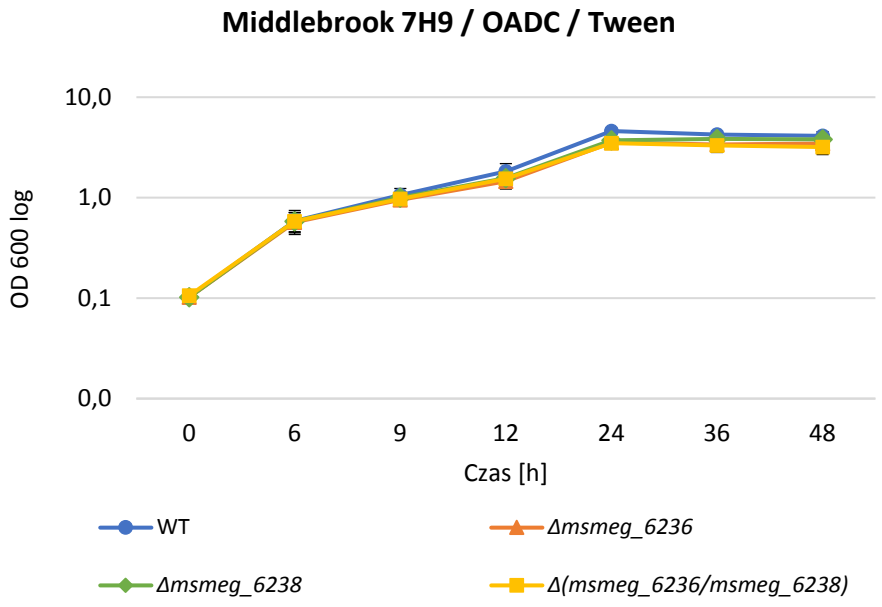
Rycina 6. Analiza genotypu mutanta Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) metodą hybrydyzacji Southern blot. **(A)** Schemat *locus* genów *msmeg_6236* i *msmeg_6238* z zaznaczeniem miejsc rozpoznawanych przez enzymy EcoRI/KpnI, sondy genetycznej, oraz wewnętrznej delecji. **(B)** Wynik hybrydyzacji typu Southern blot na matrycy chromosomalnego DNA analizowanych szczepów. 1 – marker wielkości (1kb), 2 – szczep kontrolny *M. smegmatis* mc^2 155, 3-4 – mutant typu SCO (*msmeg_6236/msmeg_6238*-Δ*msmeg_6236/msmeg_6238*), 5-7 – mutant typu DCO (Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238)*).

W celu dodatkowej weryfikacji otrzymanych mutantów przeprowadzono analizy poziomu ekspresji genów msmeg_6236 i msmeg_6238 z wykorzystaniem metody qRT-PCR. Z wybranych mutantów oraz szczepów kontrolnych izolowano RNA, który poddano ilościowej ocenie w reakcji qRT-PCR z wykorzystaniem sekwencji starterowych specyficznych dla badanych genów. Uzyskane wyniki odniesiono do poziomu ekspresji genu referencyjnego *msmeg_2758* (*sigA*). Analiza ekspresji badanych genów w szczepach

mutantach Δ*msmeg_6236* oraz Δ*msmeg_6238* wykazała brak obecności transkrypów dla analizowanych genów, potwierdzając tym samym brak funkcjonalnych genów w komórkach mutantów *M. smegmatis*.

5.1.2 Ocena znaczenia obecności funkcjonalnych genów *msmeg_6236*, *msmeg_6238* dla wzrostu komórek *M. smegmatis*

W celu zweryfikowania czy inaktywacja genów *msmeg_6236*, *msmeg_6238* oraz obu genów równocześnie wpływa na kinetykę wzrostu komórek *M. smegmatis* na podłożu bogatym przeprowadzono analizę tempa wzrostu hodowli poprzez pomiar gęstości optycznej. Hodowle prowadzono w standardowym podłożu Middlebrook 7H9 z dodatkiem OADC i Tween 80 wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.1.2.** Przeprowadzone analizy kinetyki wzrostu mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) nie wykazały statystycznie istotnych różnic w odniesieniu do szczepu kontrolnego (**Rycina 7**).

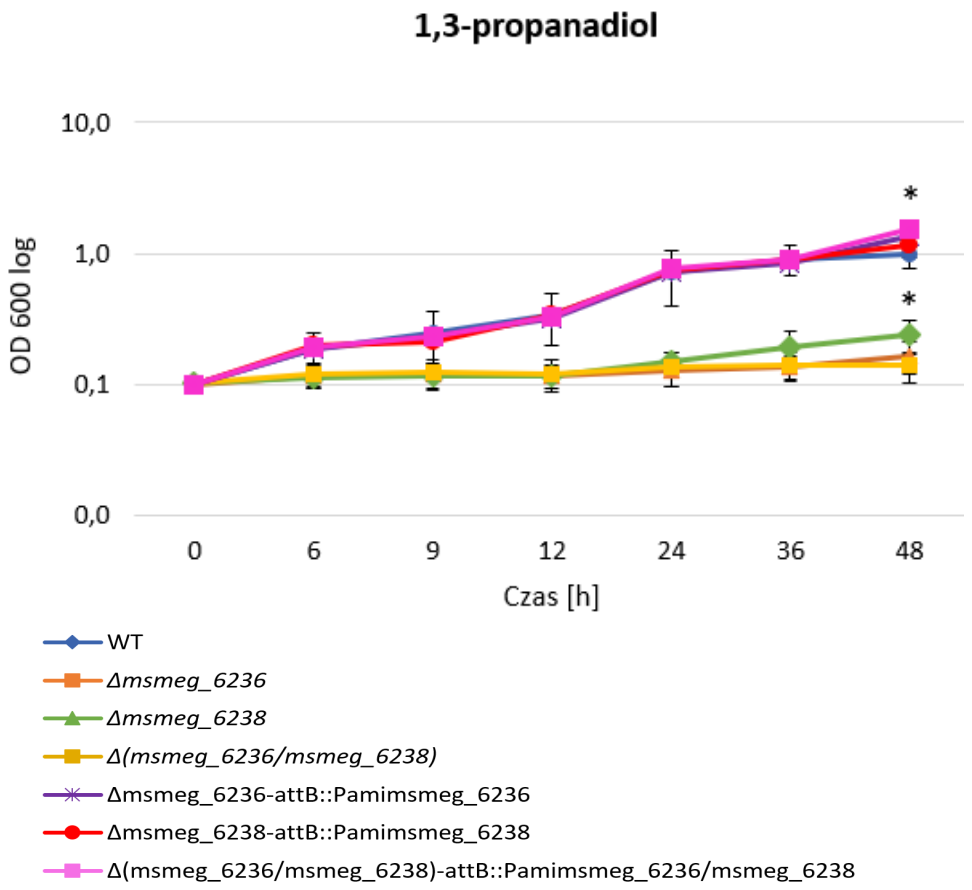


Rycina 7. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu bogatym. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

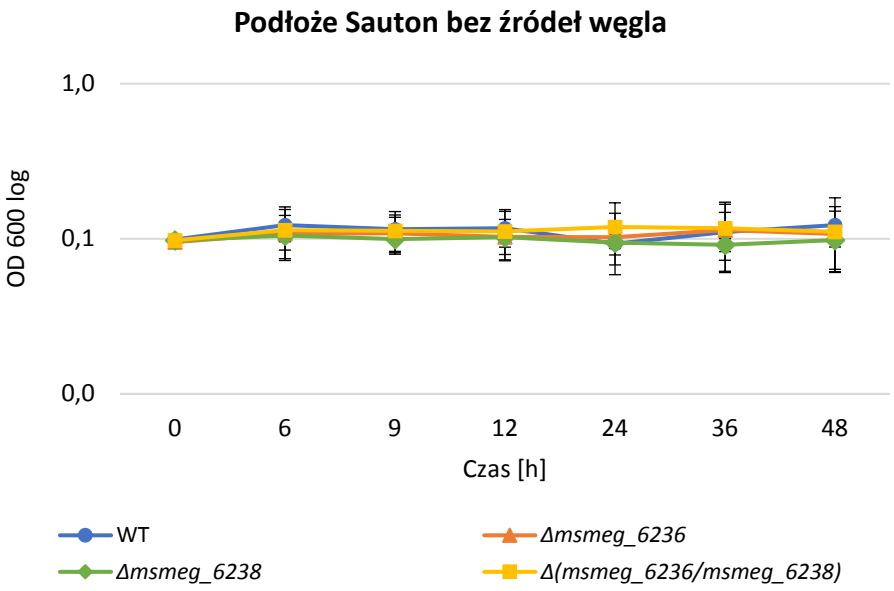
5.2. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem alkoholi jako jedynych źródeł węgla

Dane literaturowe wskazują, iż system MnoSR bierze udział w regulacji ekspresji genu *msmeg_6239* kodującego dehydrogenazę 1,3-propanadiolu, co wskazuje na udział tego systemu w regulacji metabolizmu alkoholi (Dubey i Jain, 2019).

W celu weryfikacji roli białek MSMEG_6236 i MSMEG_6238 w metabolizmie 1,3-propanadiolu przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepów mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) w obecności 1,3-propanadiolu w stężeniu końcowym 2% v/v. Do badań tych dołączono szczepy mutanty komplementowane funkcjonalną kopią genu znajdującą się pod kontrolą chemicznie indukowanego promotora (P_{ami}) wprowadzoną z wykorzystaniem wektora integracyjnego w miejsce *attB* chromosomalnego DNA. Hodowle, zarówno szczepu dzikiego, szczepów mutantów oraz szczepów komplementacyjnych Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236*,Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* i Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238)-attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238* prowadzono w podłożu Sauton pozbawionym źródeł węgla wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.18**. Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała 7-krotne zmniejszenie tempa wzrostu szczepów mutantów Δ*msmeg_6236* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) oraz 4-krotne zmniejszenie tempa wzrostu w przypadku szczepu Δ*msmeg*_6238, w obecności 1,3-propanadiolu stanowiącego jedyne źródło węgla w porównaniu do szczepu kontrolnego (**Rycina 8.**). Ponadto, w układzie kontrolnym zbadano zdolność do wzrostu szczepu „dzikiego" oraz analizowanych mutantów na podłożu minimalnym pozbawionym całkowicie dostępnych źródeł węgla. Żaden z badanych szczepów nie wykazywał zdolności do wzrostu na podłożu Sauton bez dodanego źródła węgla (**Rycina 9.**).



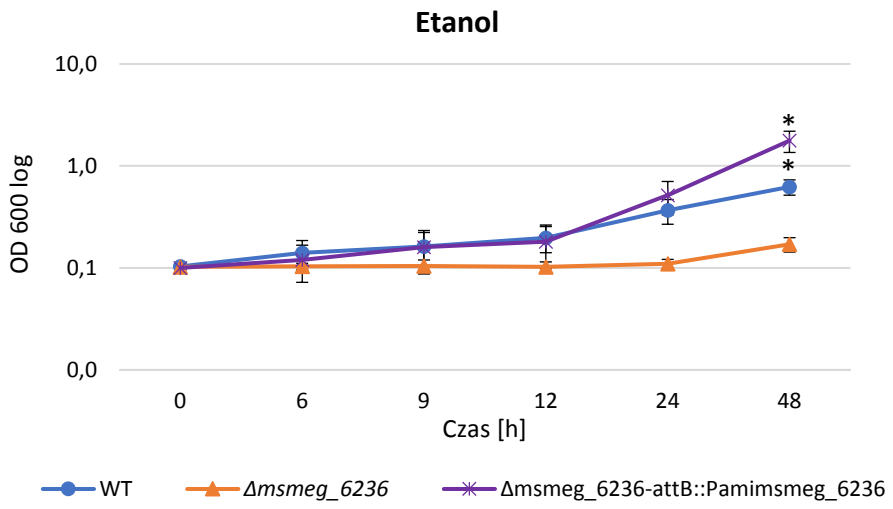
Rycina 8. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu Sauton z dodatkiem 1,3-propanadiolu w stężeniu 2%. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Δ*msmeg_6236-attB*::*Pamimsmeg_6236* – szczep komplementacyjny mutanta Δ*msmeg_6236. msmeg_6238*, Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* – szczep komplementacyjny mutanta Δ*msmeg_6238*. Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238)-attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238* – szczep komplementacyjny mutanta Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*). Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta (*$p \leq 0{,}05$).



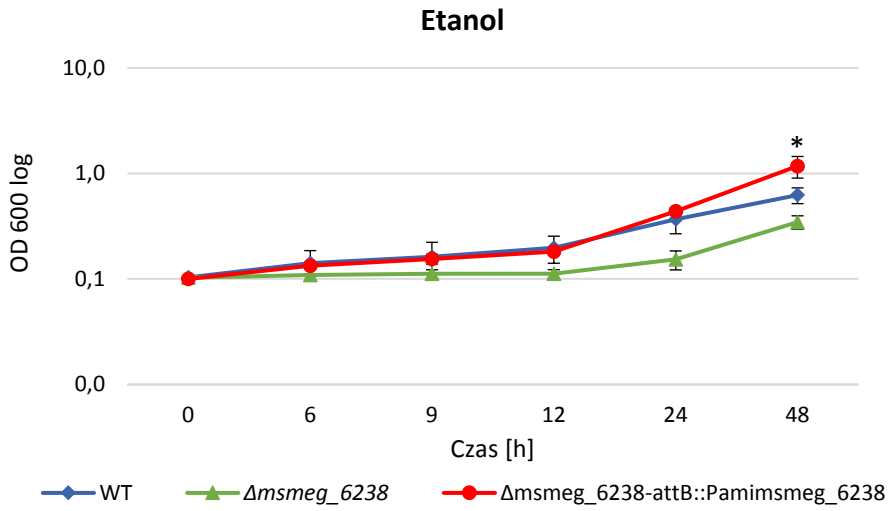
Rycina 9. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Kolejnym ze źródeł węgla, które zastosowano w badaniu kinetyki wzrostu uzyskanych mutantów i szczepu kontrolnego był etanol w stężeniu końcowym 2% v/v. Hodowle szczepu kontrolnego, szczepów mutantów oraz szczepów komplementacyjnych Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236*,Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* i Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238)-attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238* prowadzono w podłożu Sauton z etanolem jako jedynym źródłem węgla.

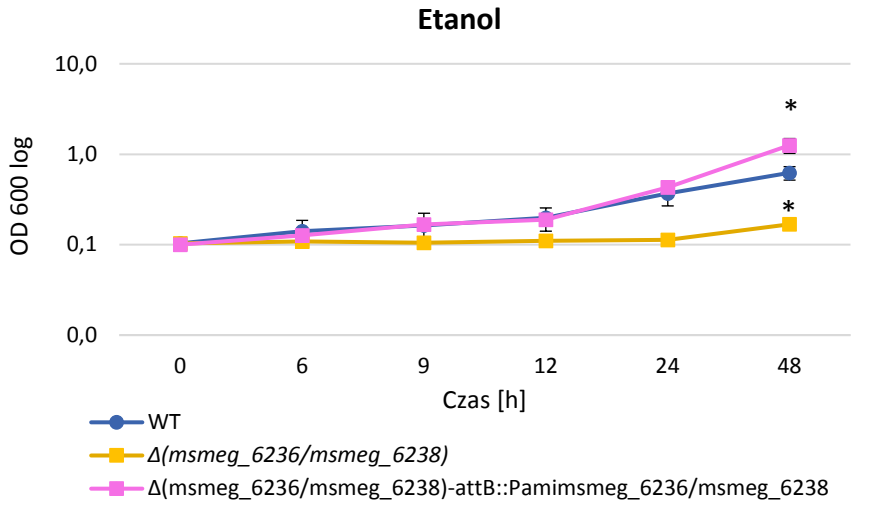
A.



B.



C.

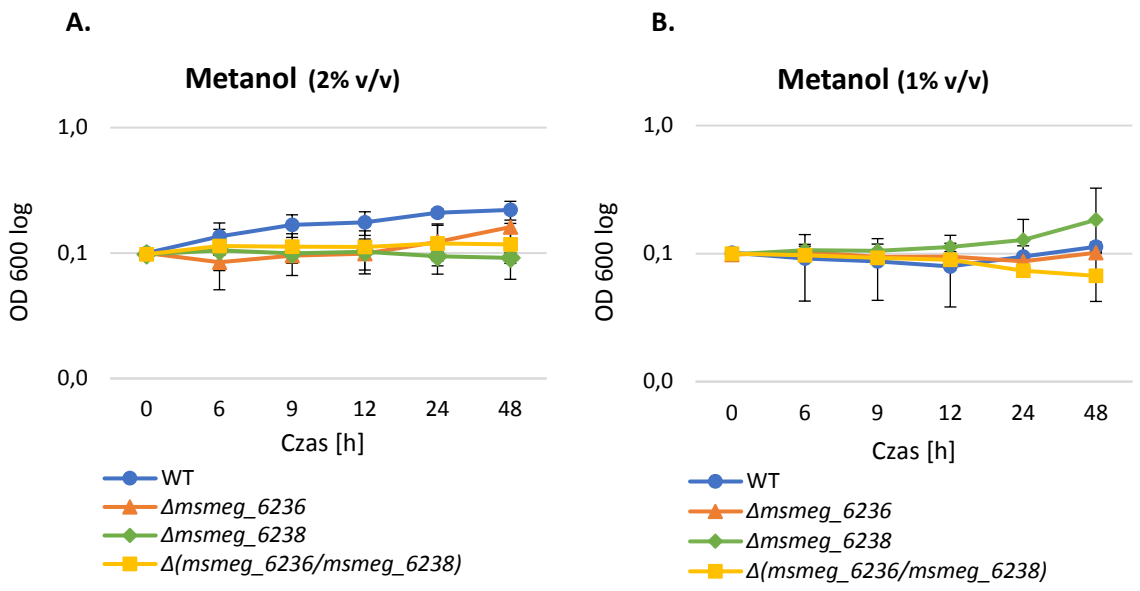


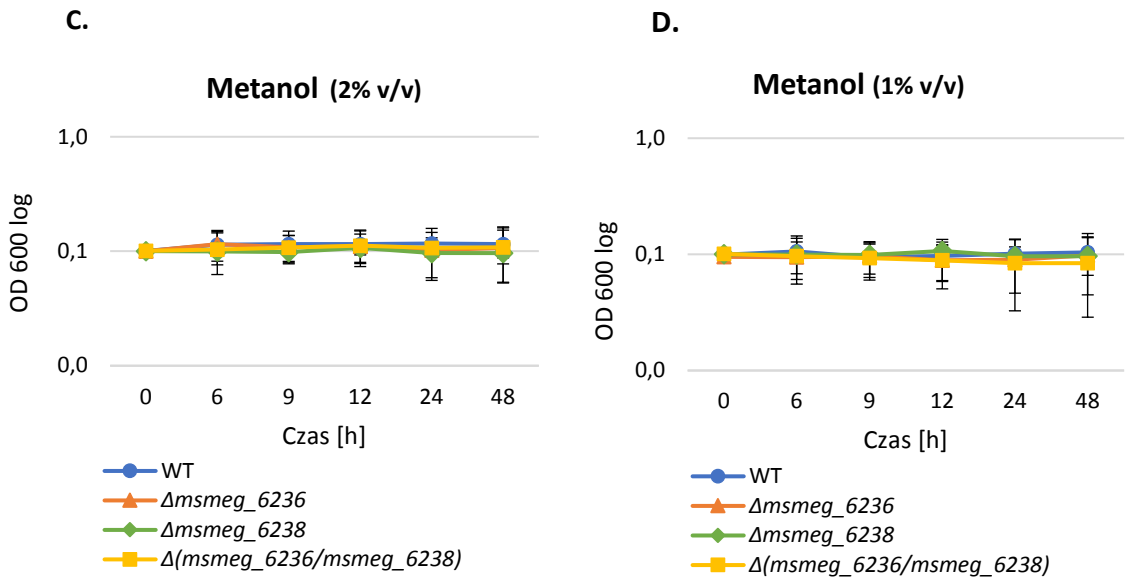
Rycina 10. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu Sauton z dodatkiem etanolu w stężeniu 2%. **(A)** WT – szczep wyjściowy „dziki”, Δ*msmeg_6236* –

mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236* – szczep komplementacyjny mutanta Δ*msmeg_6236*. **(B)** WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* – szczep komplementacyjny mutanta Δ*msmeg_6238*. **(C)** WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*, Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238)-attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238* – szczep komplementacyjny mutanta Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*). Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta (*$p \leq 0{,}05$).

Analiza kinetyki wzrostu analizowanych szczepów wykazała znaczące obniżenie tempa wzrostu w przypadku szczepu Δ*msmeg_6236*, oraz Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) hodowanych w obecności etanolu stanowiącego jedyne źródło węgla w porównaniu do szczepu kontrolnego. Niewielki stopień zahamowania wzrostu obserwowano natomiast dla szczepu mutanta Δ*msmeg_6238* (**Rycina 10.**). Komplementacje badanych mutantów funkcjonalną kopią genu P_{ami}*msmeg_6236*, *oraz* P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238* spowodowała częściowe cofnięcie efektu zahamowania wzrostu.

Kolejnym źródłem węgla analizowanym pod kątem możliwości jego wykorzystania przez badane mutanty był metanol. Analizę kinetyki wzrostu dla badanych szczepów prowadzono na podłożu minimalnym Sauton`a oraz podłożu Middlebrook 7H9 w obecności metanolu w stężeniu końcowym 1% v/v i 2% v/v.



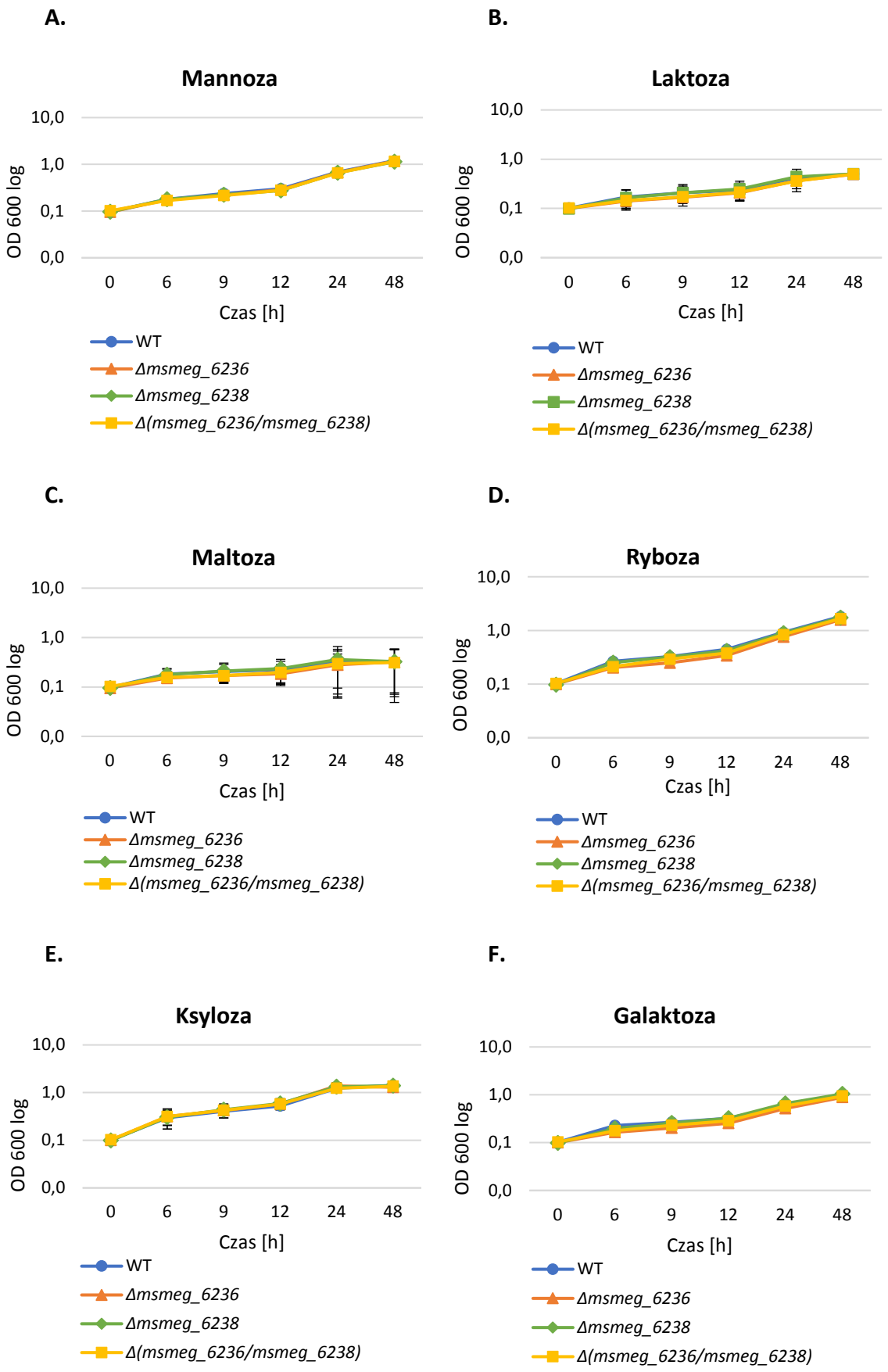


Rycina 11. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* z dodatkiem metanolu w stężeniu 1% i 2%. **(A-B)** Wzrost na podłożu Middlebrook 7H9. **(C-D)** Wzrost na podłożu minimalnym Sauton. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała, że zarówno szczep kontrolny, jak i mutanty Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) nie wykazują zdolności do metabolizowania metanolu w warunkach głodu węglowego, w przypadku zastosowania 1% metanolu. Dodatek 2% s metanolu umożliwiał niewielki wzrost wyłącznie szczepu kontrolnego do OD_{600} 0.2 (**Rycina 11A-D.**).

5.3. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem węglowodanów

W celu zbadania potencjalnego wpływu inaktywacji genów *msmeg_6236*, *msmeg_6238* i *msmeg_6236/msmeg_6238* na zdolność *M. smegmatis* do metabolizmu cukrów prostych oraz dwucukrów przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepów mutantów w obecności wybranych związków cukrowych stanowiących jedyne źródła węgla, w stężeniu końcowym 0,5% v/v. Hodowle szczepu kontrolnego oraz badanych mutantów prowadzono w podłożu minimalnym Sauton'a z dodatkiem 0,5% v/v mannozy, laktozy, maltozy, rybozy, ksylozy i galaktozy.



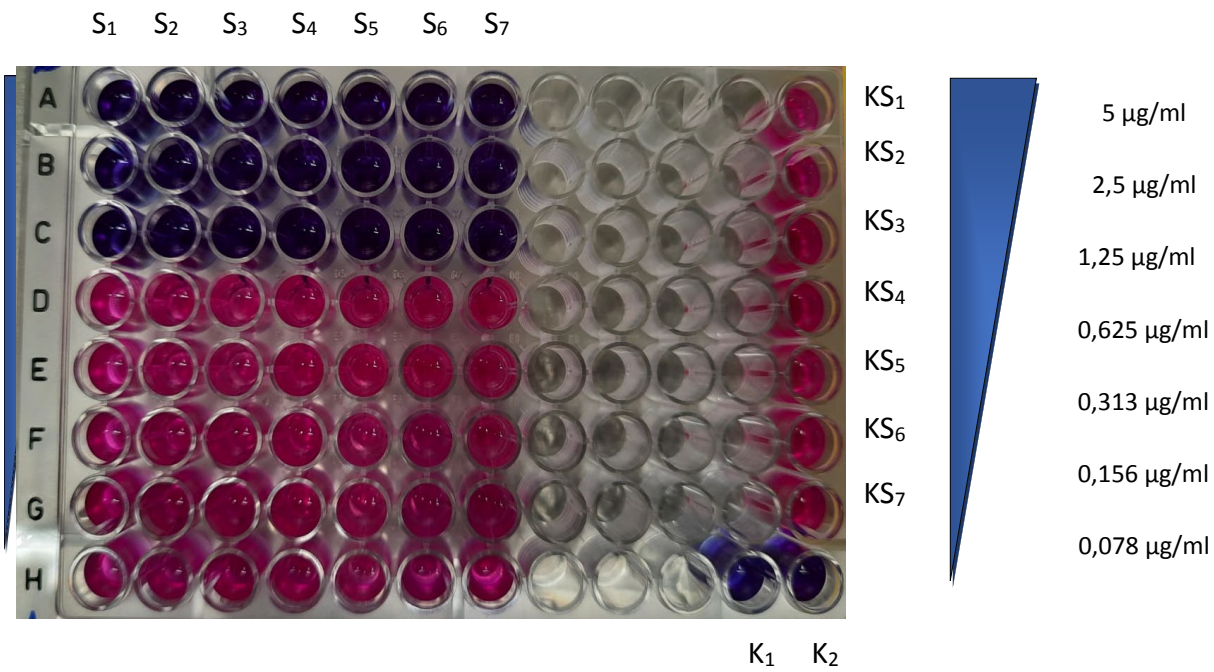
Rycina 12. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu Sauton z dodatkiem związków cukrowych. **(A)** Mannozy. **(B)** Laktozy. **(C)** Maltozy. **(D)** Rybozy. **(E)**

Ksylozy. **(F)** Galaktozy. WT – szczep kontrolny „dziki”, Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Przeprowadzone analizy wykazały, że inaktywacja genów *msmeg_6236* lub *msmeg_6238* nie wpływa na zdolność do rozkładu badanych cukrów prostych oraz dwucukrów przez *M. smegmatis* (**Rycina 12A-F.**).

5.4. Analiza wrażliwości szczepów *M. smegmatis* pozbawionych funkcjonalnych genów *msmeg_6236* i *msmeg_6238* na wybrane antybiotyki

W celu sprawdzenia czy szczepy mutanty pozbawione funkcjonalnych białek systemu dwukomponentowego MnoSR wykazują zmienioną wrażliwość na wybrane antybiotyki przeprowadzono analizy wzrostu skonstruowanych mutantów z wykorzystaniem testu mikropłytkowego [Microplate Alamar Blue Assay (MABA)]. Test MABA pozwala na określenie minimalnego stężenia hamującego wzrost drobnoustrojów (MIC). Analizę wrażliwości szczepu kontrolnego, szczepów mutantów [Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg*_6238, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*)] oraz mutantów komplementowanych funkcjonalną kopią genu [Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*)-*attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238*] przeprowadzono z wybranymi tuberkulostatykami (rifampicyną, etambutolem, ofloksacyną), antybiotykami należącymi do grupy aminoglikozydów (streptomycyną, apramycyną, dihydrostreptomycyną, sisomycyną) oraz tetracykliną. Test MABA wykonano wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.26**.



Rycina 13. Analiza wrażliwości szczepów *M. smegmatis* na apramycynę. S_1 – szczep kontrolny „dziki”, S_2 – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, S_3 – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, S_4 – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*, S_5 – szczep komplementacyjny Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236*, S_6 – szczep komplementacyjny Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238*, S_7 – szczep komplementacyjny Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238)-attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach. K_1 – kontrola czystości mikrobiologicznej podłoża Middlebrook 7H9, K_2 – kontrola czystości mikrobiologicznej antybiotyku, KS_1-KS_7 – kontrole czystości mikrobiologicznej analizowanych szczepów.

Przeprowadzona analiza pozwoliła na wyznaczenie wartości MIC dla szczepu kontrolnego oraz szczepów mutantów w stosunku do wszystkich badanych antybiotyków. W przypadku etambutolu, ofloksacyny i tetracykliny wyznaczona wartość MIC wyniosła 0,5 µg/ml i była identyczna dla wszystkich badanych szczepów. W przypadku streptomycyny i dihydrostreptomycyny wyznaczona wartość MIC wyniosła 0,625 µg/ml i również nie różniła się pomiędzy mutantami i szczepem kontrolnym. Podobnie nie zaobserwowano różnic w przypadku szczepu kontrolnego i mutantów w wartości MIC dla apramycyny (**Rycina 13.**), sisomycyny i rifampicyny, którą wyznaczono odpowiednio jako 1,25 µg/ml, 4 µg/ml i 5 µg/ml (**Tabela 23.**).

Dodatkowo, w przypadku wybranych antybiotyków (apramycyny, dihydrostreptomycyny, sisomycyny, tertracykliny i rifampicyny) do analizy włączono także szczepy komplementacyjne Δ*msmeg_6236-attB*::P_{ami}*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238-attB*::P_{ami}*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*)-*attB*::P_{ami}*msmeg_6236/msmeg_6238.* Przeprowadzona analiza wykazała, iż badane szczepy mutanty oraz szczepy posiadające komplementację funkcjonalnych genów charakteryzują się takim samym poziomem wrażliwości na badane antybiotyki jak szczep kontrolny mc^2 155 (**Tabela 23.**).

Tabela 23. Wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost badanych szczepów *M. smegmatis* w obecności antybiotyków.

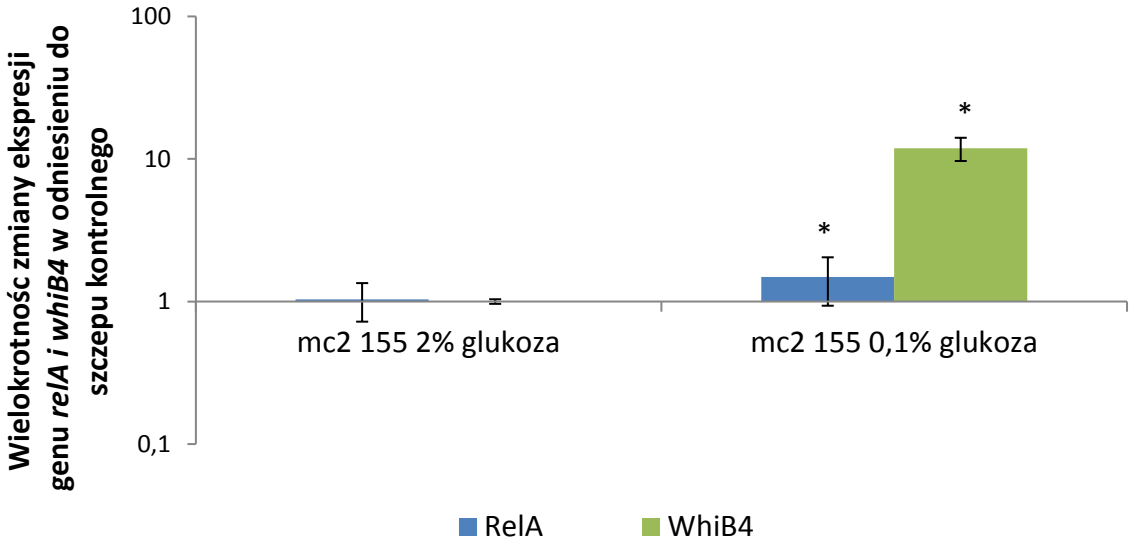
Antybiotyk	MIC (µg/ml)						
	mc^2 155	Δ*msmeg_6236*	Δ*msmeg_6238*	Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*)	Δ*msmeg_6236-msmeg_6236*	Δ*msmeg_6238-msmeg_6238*	Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*)-*msmeg_6236/msmeg_6238*
Etambutol	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Ofloksacyna	0,5	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Streptomycyna	0,625	0,625	0,625	0,625	-	-	-
Apramycyna	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Dihydrostrep-tomycyna	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
Rifampicyna	5	5	5	5	5	5	5
Sisomycyna	4	4	4	4	4	4	4
Tetracyklina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

5.5.Globalna analiza transkryptomiczna mutantów *Δmsmeg_6236* i *Δmsmeg_6238*

Ze względu na słabo poznaną rolę białek MSMEG__6236 i MSMEG_6238 w metabolizmie *M. smegmatis,* szczep pozbawiony funkcjonalnych kopii obu badanych

genów, poddano globalnej analizie transkryptomicznej. Do przeprowadzenia analiz wykorzystano całkowity RNA izolowany z komórek szczepu kontrolnego oraz mutanta Δ(*msmeg_*6236/msmeg_*6238*) hodowanych na podłożu minimalnym z dodatkiem 2% glukozy, w warunkach niedoboru źródeł węgla na podłożu minimalnym z dodatkiem 0,1% glukozy oraz na podłożu minimalnym z dodatkiem 0,1% glukozy oraz 2% 1,3-propandiolu (**Tabela 24.**).

Przed przystąpieniem do przygotowania bibliotek RNA, dla potrzeb sekwencjonowania RNA, zbadano czy zastosowane warunki wzrostu w obecności 0,1% glukozy prowadzą do „głodu węglowego". W tym celu izolowany RNA wykorzystano w reakcji RT qPCR dla określenia poziomu ekspresji genów *relA* i *whiB4,* wskazujących na odpowiedź komórki związaną z deficytem źródeł węgla (**Metody 4.22.6.**).



Rycina 14. Profile ekspresji genów *relA* i *whiB4* w szczepie kontrolnym oraz mutancie Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) hodowanych w warunkach głodu węglowego oraz dostępności węgla.

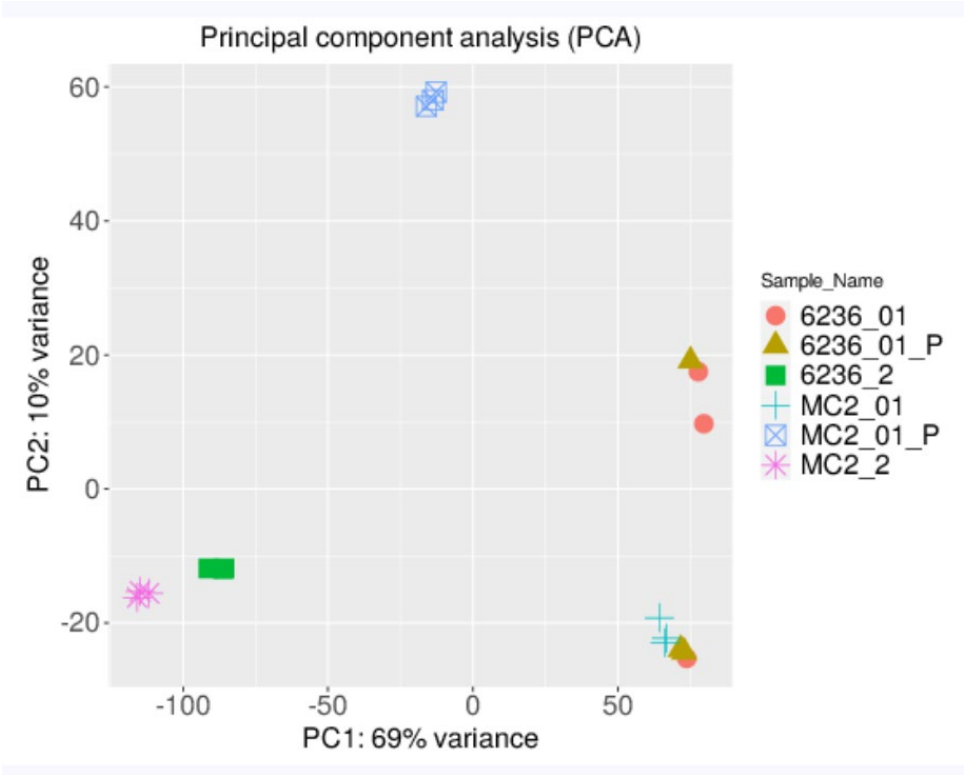
Poziom analizowanych transkryptów wyznaczono poprzez odniesienie do poziomu ekspresji genu *sigA* (genu referencyjnego), z wykorzystaniem metody komparatywnej. Zaobserwowano zwielokrotnienie poziomu transkryptów dla badanych genów *relA* oraz *whiB4* w szczepie mutancie hodowanym w warunkach głodu węglowego wskazujące na odpowiedź komórek na deficyt dostępności węgla w podłożu (**Rycina 14.**).

Tabela 24. Oznaczenia układów doświadczalnych poddanych analizie RNA-seq, wykorzystanych podczas obróbki danych.

Oznaczenie układu doświadczalnego	Układ doświadczalny
0,1% G	Hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy (G) w stężeniu końcowym 0,1% v/v
2% G	Hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy (G) w stężeniu końcowym 2% v/v
0,1% G + 2% P	Hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy (G) w stężeniu końcowym 0,1% v/v i 1,3-propanadiolu (P) w stężeniu końcowym 2% v/v

Uzyskane dane transkryptomiczne dla wszystkich szczepów hodowanych w ww. warunkach zostały poddane analizie w programach DeGust oraz iDEP.96. Dane nieprzetworzone uzyskane w ramach analizy RNA-seq, zostały dołączone do pracy w postaci suplementu (**Tabela S1.**).

Przeprowadzona analiza PCA (ang. *principal component analysis*) pokazała, że powtórzenia wykonane dla każdego szczepu oraz dla poszczególnych warunków grupują się niezależnie z wyjątkiem powtórzeń wykonanych dla szczepu mutanta w warunkach 0,1% G oraz 0,1% G + 2% P (**Rycina 15.**).



Rycina 15. Analiza głównych składowych (PCA). 6236_01, MC2_01 – hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy w stężeniu końcowym 0,1%; 6236_01_P, MC2_01_P – hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy w stężeniu końcowym 0,1% i 1,3-propanadiolu (P) w stężeniu końcowym 2%; 6236_2, MC2_2 – hodowle prowadzone w podłożu 7H9 z dodatkiem glukozy w stężeniu końcowym 2%.

Analiza porównawcza danych transkryptomicznych dla RNA izolowanego z komórek szczepu kontrolnego oraz mutanta Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) przeprowadzona z wykorzystaniem platformy analitycznej iDEP.96, pozwoliła na określenie liczby genów, które charakteryzowały się istotnie zmienionym poziomem ekspresji (ang. *differential expressed genes-DEGs*) przy poziomie odcięcia (Log2FC =|1.583|; fold change = |3|; $p > 0.05$ – zmiana 3-krotna lub większa) (**Rycina 16.**).

	2% G 6236/8 vs 2% G mc2	0,1% G 6236/8 vs 2% G 6236/8	0,1% G mc2 vs 2% G mc2	0,1% G + 2% P 6236/8 vs 0,1% G + 2 % P mc2	0,1% G 6236/8 vs 0,1% G mc2	0,1% G + 2% P 6236/8 vs 0,1% G 6236/8	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2
Up	618	1859	1765	1326	281	2	1584
Down	286	2298	2447	1583	196	7	1236

Rycina 16. Liczba genów wykazujących zmieniony poziom ekspresji w analizowanych układach. Ang. *down* – liczba genów ulegających represji; *up* – liczba genów ulegających indukcji

Tak jak się spodziewano, największe zmiany poziomu ekspresji genów zaobserwowano porównując dane uzyskane dla szczepów rosnących w podłożu z dodatkiem 2% glukozy w porównaniu do szczepów znajdujących się w warunkach niedoboru źródła węgla (0,1% G 6236/8 vs 2% G 6236/8 oraz 0,1% G mc2 vs 2% G mc2). Zmiany te, dotyczyły odpowiedzi komórek *M. smegmatis* na warunki, indukowane głodzeniem węglowym (**Rycina 16.**). Znaczące zmiany, zaobserwowano również w ekspresji genów w układach 0,1% G w porównaniu do 0,1% G + 2% P lecz wyłącznie dla szczepu kontrolnego. Uzyskane wyniki wskazują na wydajne wykorzystanie 1,3-propandiolu jako źródła węgla przy niedoborze glukozy przez *M. smegmatis* oraz o zablokowaniu tej możliwości u mutanta poprzez inaktywację genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Ponadto zaobserwowano znaczące różnice w ekspresji genów szczepu kontrolnego oraz mutanta na podłożu 0,1% G + 2% P (1326 up/1583 down) wynikające z braku zdolności szczepu mutanta do rozkładu 1,3-propandiolu skutkującym głodzeniem

węglowym szczepu mutanta, lecz nie szczepu kontrolnego, który jest zdolny do wykorzystania źródła węgla obecnego w podłożu (**Rycina 16.**). Mniejszą zmienność ekspresji genów zaobserwowano porównując szczep kontrolny oraz mutanta hodowanych na podłożu z dodatkiem 2% glukozy (618 up/286 down) oraz w warunkach głodu węglowego w obecności 0,1% glukozy (281 up/196 down). Obserwowane różnice pomiędzy szczepem „dzikim" i mutantem wynikają jednak prawdopodobnie nie z różnic w zdolności do wykorzystania obecnego w podłożu źródła węgla, lecz z bezpośredniej lub pośredniej roli *msmeg_6236/msmeg_6238* w regulacji określonych procesów metabolicznych w komórce znajdującej się w warunkach niedoboru węgla lub w obecności glukozy. Najmniejsza zmienność w poziomie ekspresji genów dotyczyła szczepu mutanta hodowanego w warunkach głodzenia węglowego (0,1 % glukoza) bez lub z dodatkiem 2% 1,3-propandiolu (2 up/7 down). Biorąc pod uwagę obserwowane zmiany w ekspresji ponad 2800 genów w szczepie kontrolnym, w tych samych warunkach (0,1% glukoza vs 0,1% glukoza-2% 1,3-propandiol) można przyjąć, że wynikają one bezpośrednio ze zdolności szczepu „dzikiego" do wykorzystania 1,3-propandiolu jako jedynego źródła węgla (**Rycina 16.**).

Przeprowadzona analiza transkryptomiczna z wykorzystaniem platform KEGG i Degust RNA-seq, pozwoliła na wskazanie procesów metabolicznych regulowanych przez geny charakteryzujące się największym zróżnicowaniem poziomu ekspresji wśród analizowanych układów eksperymentalnych. Uzyskane dane przedstawiono w **Tabeli 25**.

Tabela 25. Poziom zróżnicowania genów poddanych analizie RNA-seq w warunkach głodu węglowego oraz nielimitowanego dostępu glukozy, z uwzględnieniem procesów metabolicznych regulowanych przez grupę najbardziej zróżnicowanych genów.

Proces metaboliczny	Układy eksperymentalne poddane analizie RNA-seq						
	A	B	C	D	E	F	G
	2% G Δ6236/8 vs 2% G mc2	0,1% G Δ6236/8 vs 2% G Δ6236/8	0,1% G mc2 vs 2% G mc2	0,1% G + 2% P Δ6236/8 vs 0,1% G + 2% P mc2	0,1% G Δ6236/8 vs 0,1% G mc2	0,1% G + 2% P Δ6236/8 vs 0,1% G Δ6236/8	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2
Biosynteza aminoacyl-tRNA			- 8,1	- 10,98			
Biosynteza argininy		- 10,66	- 9,88		4,72 - 4,44		- 6,06 7,04
Biosynteza fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu			- 8,58	- 9,94			11,2

Biosynteza kwasów tłuszczowych	10,28	10,76 - 9,6		- 10,86			10,54
Biosynteza kwasu foliowego		- 9,48					
Biosynteza lizyny			- 8,24				
Biosynteza pantotenianu i CoA		10,64 - 10,86			- 4,36		
Biosynteza szkieletu terpenoidowego			- 8,22				
Cykl cytrynowy (TCA)		10,34	15,18				
Degradacja benzoesanów		11,6		- 8,74			7,84
Degradacja chloroalkanów i chloroalkenów				7,22			
Degradacja fluorobenzoesanu		11,6					
Degradacja ksylenu		11,6					
Degradacja lizyny							6,38
Degradacja waliny, leucyny i izoleucyny		11,06			4,28		6,38
Fosforylacja oksydacyjna		22,18	19,12 - 8,66		5,32		
Glikoliza / Glukoneogeneza	10,5	11,88		7,22			6,58 - 8,14
Interkonwersja pentozy i glukuronianu		13,78	20,7	9,16	- 7,58		- 11,98
Metabolizm alaniny, aspartanu i glutaminianu		11,52 - 9,64	14,16	7,82 - 9,2			10,1 - 9,18
Metabolizm aminokwasów i cukrów nukleotydowych		10,26	- 8,12	6,54			- 6,6
Metabolizm argininy i proliny		15,48	7,32				7,32 - 6,26
Metabolizm askorbinianu i aldaranu		13,78	17,54	9,16			
Metabolizm azotu							10,1 - 6,06
Metabolizm beta-alaniny		11,52 - 10,2	14,16	- 9,28	5,24 - 4,36		11,1 - 6,4
Metabolizm biotyny		10,76					
Metabolizm butanianu		10,34	14,16		4,28		7,84 - 6,4
Metabolizm cysteiny i metioniny		- 11,32		6,68 - 9,24			8,9
Metabolizm fosforanu inozytolu		11,62	15,94	6,7 - 9,28	4,94		11,1 - 7,8
Metabolizm fruktozy i mannozy	8,86	10,26		6,66			- 6,3
Metabolizm galaktozy	8,86		- 8,12				
Metabolizm glicerolipidów		- 9,54	- 9,58	6,06	- 8,24		6,5 - 10,72
Metabolizm glicyny, seryny i treoniny		- 12,96	- 12,98				

Metabolizm glioksylanów i dikarboksylanów		12,28	15,18	- 13,56	4		10,84 - 6,06
Metabolizm histydyny		10,48		6,32			- 6,9
Metabolizm metanu	10,5	11,68	17,1	7,54	4,04		6,58 - 7,74
Metabolizm pirogronianu	10,5	11,88					6,58 - 8,14
Metabolizm pirymidyn		10,64 - 10,42	- 9,32	- 12,98			13,3 - 6,06
Metabolizm propionianu		11,52	14,16	- 9,28	4,94		11,1 - 6,4
Metabolizm puryn		10,32 - 10,42	15,6 - 9,88		4,72		
Metabolizm selenozwiązków					4,38		
Metabolizm siarki		- 9,56		6,68 - 8,04			6,58
Metabolizm skrobi i sacharozy			15,02				
Metabolizm tryptofanu							6,38
Metabolizm tyrozyny				7,22			- 8,14
Szlak pentozofosforanowy	8,86				- 5,42	4	- 9,02
Ubichinon i inna biosynteza terpenoidowo-chinonowa		10,16					

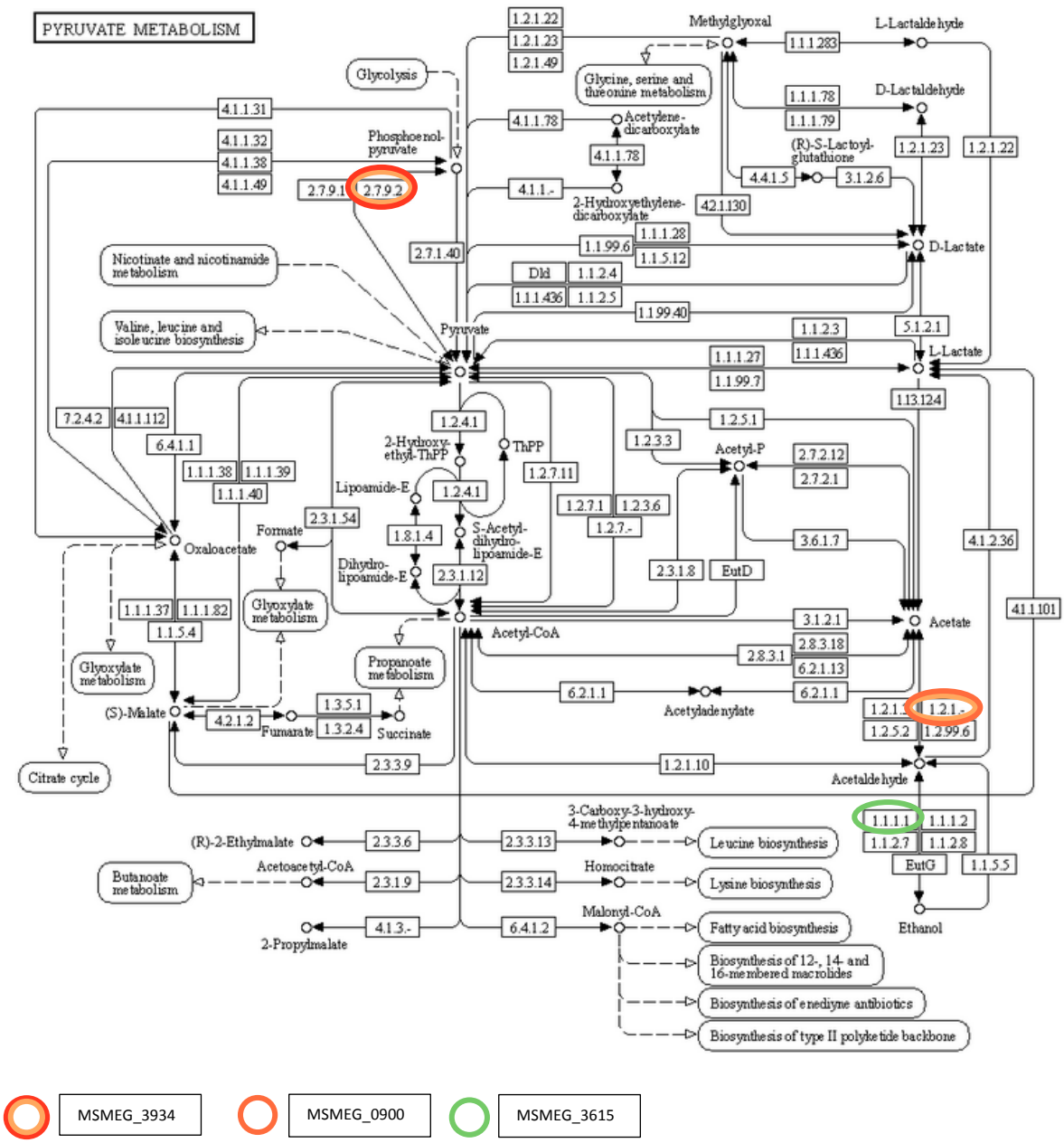
5.6. Analiza ścieżek metabolicznych indukowanych w szczepie dzikim mc^2 155 i szczepie delecyjnym Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) poddanych analizie RNA-seq w warunkach głodu węglowego oraz nielimitowanego dostępu glukozy

Niedobory węgla w środowisku wzrostu zmuszają komórkę bakteryjną do znaczącego przestawienia metabolizmu i ograniczenia procesów biosyntetycznych zachodzących w komórce. Stąd też, możemy założyć, że zmiany obserwowane w analizach porównawczych przedstawionych dla szczepu kontrolnego oraz mutanta na podłożu z 2% i 0,1% glukozą wynikają z globalnej odpowiedzi komórki na głodzenie węglowe. Podobny efekt obserwujemy w przypadku porównania transkryptomów szczepu kontrolnego hodowanego w obecności 0,1% glukozy z, lub bez, dodatku 1,3-propandiolu. Komórki pozbawione tego źródła węgla znajdują się w warunkach głodu węglowego i dostosowują odpowiednio swój metabolizm. Dlatego też zmiany obserwowane w licznych szlakach metabolicznych zamieszczone w kolumnach B, C, D, G **Tabeli 25** są prawdopodobnie wynikiem bezpośredniej odpowiedzi komórki na głodzenie węglowe. Mniej liczne zmiany dotyczą porównania szczepu „dzikiego" i mutanta rosnących na podłożach z 2% glukozą (kolumna A, **Tabela 25.**) lub znajdujących się w warunkach głodu węglowego (kolumna E, **Tabela 25.**). W tym przypadku, obserwowane różnice w transkryptomach porównywanych

szczepów wynikają bezpośrednio lub pośrednio z obecności funkcjonalnego układu TCS MnoSR. W warunkach wzrostu w obecności 2% glukozy (kolumna A, **Tabela 25.**), różnice te dotyczą przede wszystkim biosyntezy kwasów tłuszczowych, glikolizy, metabolizmu metanu, pirogronianu oraz szlaku pentozofosforanowego. W warunkach głodzenia węglowego (kolumna E, **Tabela 25.**) identyfikowane różnice dotyczyły biosyntezy argininy, pantoenianu, CoA, degradacji waliny, leucyny i izoleucyny, fosforylacji oksydacyjnej, metabolizmu beta-alaniny, butynianu, fosforanu izotynolu, glicerolipidów, metanu, glioksylanów i dikarboksylanów, puryn oraz szlaku pentozofosforanowego. W dalszej części przedstawiam w sposób bardziej szczegółowy wybrane procesy ze wskazaniem enzymów, których ekspresja uległa zmianie w badanych warunkach.

Metabolizm pirogronianu

Pirogronian, będący jednym z produktów końcowych procesu glikolizy powstaje z przekształcenia fosfoenolopirogronianu przez enolazę, w obecności ADP. W warunkach tlenowych pirogronian zostaje przekształcony do acetylo-CoA przez dehydrogenazę pirogronianową i zostaje włączony w reakcje cyklu kwasu cytrynowego. Natomiast, w warunkach beztlenowych pirogronian zostaje przekształcony w mleczan przez dehydrogenazę mleczanową, przy jednoczesnym odtworzeniu NAD^+, co pozwala na kontynuację procesu glikolizy mimo braku tlenu. Pirogronian biorący udział w cyklu kwasu cytrynowego, ulega wielokierunkowym przemianom, odgrywając m.in. rolę w wytwarzaniu prekursorów dla szeregu procesów biosyntetycznych takich jak synteza aminokwasów, puryn, pirymidyn czy glukozy, jak również uczestniczy w procesach katabolicznych, pełniąc rolę substratu energetycznego (Cordova i Alper, 2016).

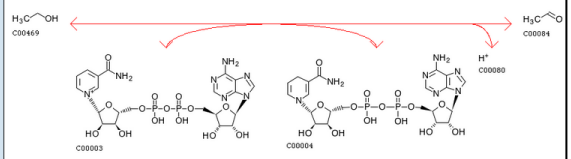


Rycina 17. Szlaki metaboliczne przemian pirogronianu z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 26. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm pirogronianu zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

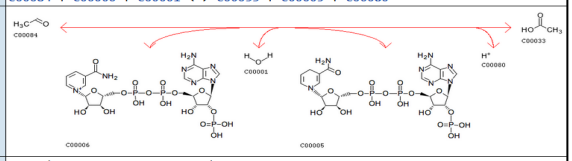
Metabolizm pirogronianu

M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_3615	Rv1862	Białko rodziny dehydrogenaz alkoholowych wiążących cynk	-	- 8,14	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R00754 Reaction
Name	ethanol:NAD+ oxidoreductase
Definition	Ethanol + NAD+ <=> Acetaldehyde + NADH + H+
Equation	C00469 + C00003 <=> C00084 + C00004 + C00080
	
Comment	NADP+ (ec 1.1.1.71, see R00746)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00088 C00084_C00469
Enzyme	1.1.1.1 1.1.1.71
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

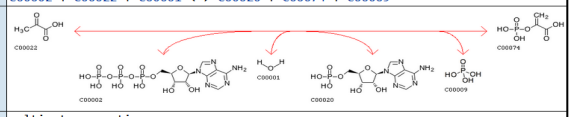
Enzym: EC 1.1.1.1
- dehydrogenaza alkoholowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - alkohol pierwszorzędowy
  - NAD+
  - alkohol drugorzędowy
- produkty:
  - aldehyd
  - NADH
  - H+
  - keton

MSMEG_0900	-	Dehydrogenaza aldehydowa indukowana eptc	11,88	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

Entry	R00711 Reaction
Name	Acetaldehyde:NADP+ oxidoreductase
Definition	Acetaldehyde + NADP+ + H2O <=> Acetate + NADPH + H+
Equation	C00084 + C00006 + C00001 <=> C00033 + C00005 + C00080
	
Comment	NAD+ (ec 1.2.1.5, see R00710)
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00047 C00033_C00084
Enzyme	1.2.1.4 1.2.1.5 1.2.1.-
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.2.1.-
- dehydrogenaza aldehydowa indukowana eptc
- oksydoreduktaza

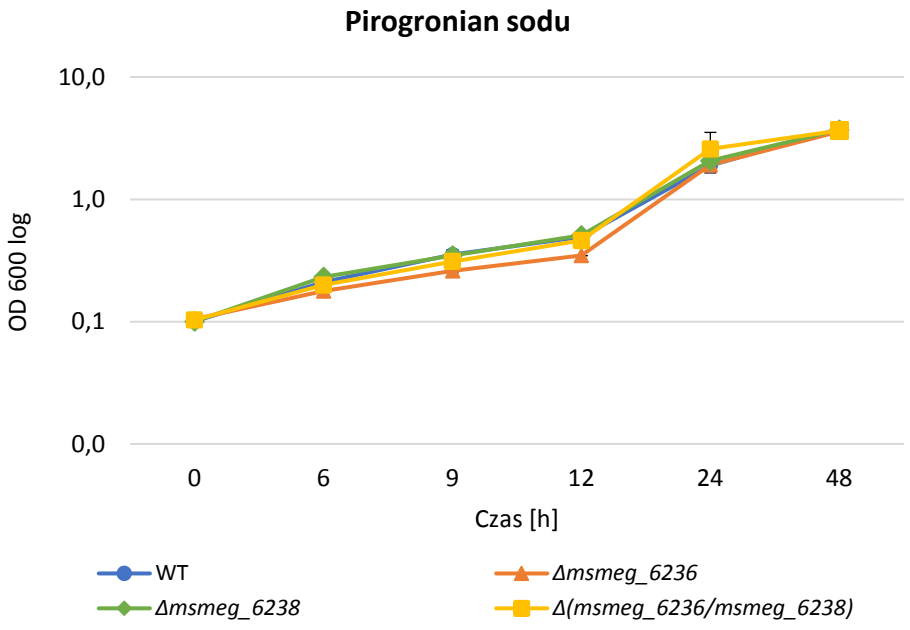
MSMEG_3934	-	Syntaza fosfoenolopirogronianowa	10,5	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
			6,58	-	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R00199 Reaction
Name	ATP:pyruvate,water phosphotransferase
Definition	ATP + Pyruvate + H2O <=> AMP + Phosphoenolpyruvate + Orthophosphate
Equation	C00002 + C00022 + C00001 <=> C00020 + C00074 + C00009
	
Comment	multi-step reaction
Reaction class	RC00002 C00002_C00020 RC00015 C00022_C00074
Enzyme	2.7.9.2
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn00680 Methane metabolism rn00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism

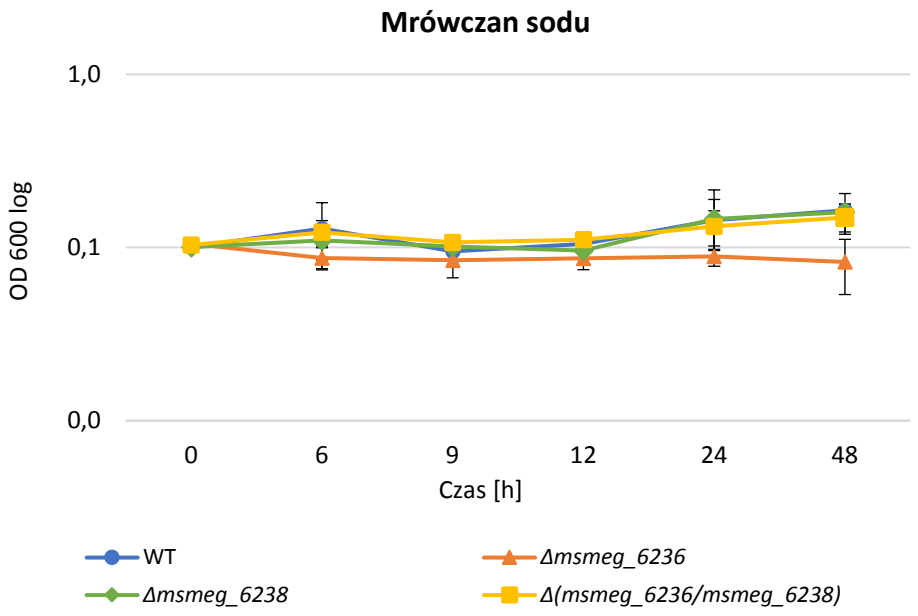
Enzym: EC 2.7.9.2
- pirogronian, dikinaza wodna
- transferaza
- substraty:
  - ATP
  - pirogronian
  - H_2O
- produkty:
  - AMP
  - fosfoenolopirogronian
  - fosforan

Ze względu na obserwowaną zmianę w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm pirogronianu w szczepie pozbawionym funkcjonalnego systemu MnoSR postanowiono sprawdzić czy szczep mutant będzie zdolny do pozyskiwania pirogronianu jako jedynego źródła węgla (**Rycina 17.**). W tym celu przeprowadzono analizę

kinetyki wzrostu szczepu „dzikiego” oraz mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) w obecności pirogronianu sodu (**Rycina 18.**) i mrówczanu sodu (**Rycina 19.**), w stężeniu końcowym 0,5 % v/v. Hodowle wszystkich badanych szczepów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.20**.



Rycina 18. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem pirogronianu sodu. WT – szczep wyjściowy „dziki”, Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.



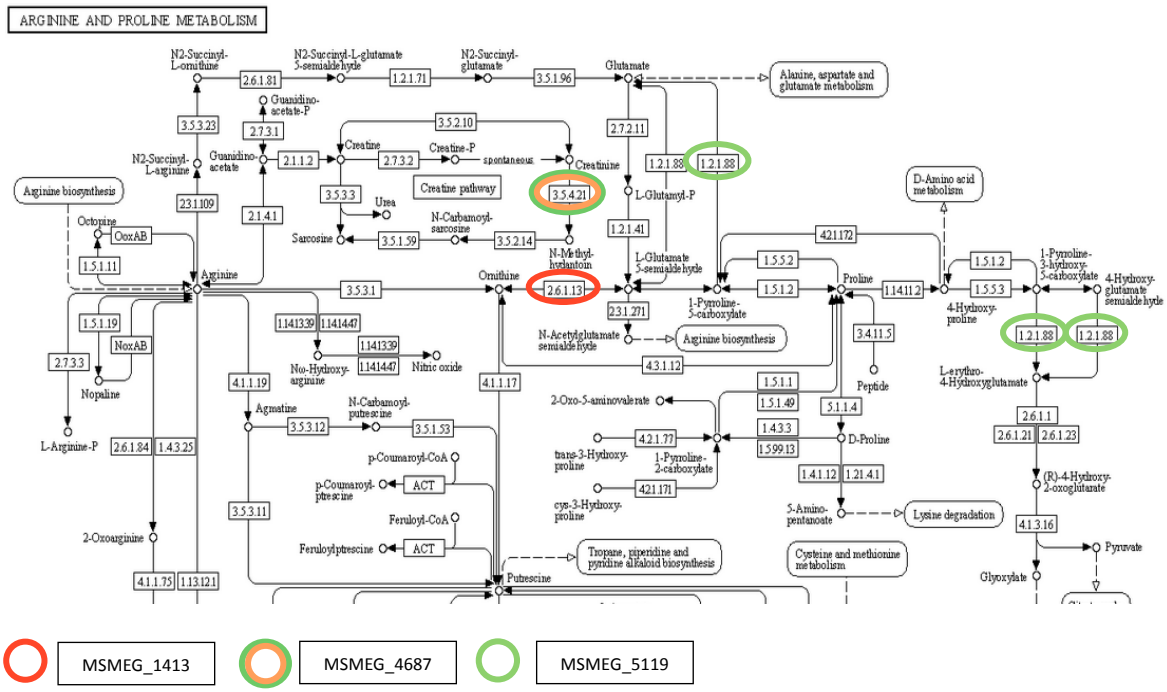
Rycina 19. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem mrówczanu sodu. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała, iż zarówno szczep kontrolny jak i mutanty Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) posiadają zdolność do metabolizowania pirogronianu jako jedynego źródła węgla, uzyskując w 48 godzinie eksperymentu wartość współczynnika gęstości optycznej około 3,5. Przeprowadzone analizy nie wykazały różnic w kinetyce wzrostu badanych szczepów (**Rycina 18.**).

Zastosowanie w tych samych warunkach jako źródła węgla i energii mrówczanu sodu nie pozwoliło na uzyskanie wzrostu badanych szczepów co wskazuje, że związek ten nie jest metabolizowany przez *M. smegmatis* w warunkach przeprowadzonego eksperymentu (**Rycina 19.**).

Metabolizm argininy i proliny

Prolina, zaliczana do hydrofobowych aminokwasów alifatycznych zawiera aromatyczny łańcuch boczny związany z grupą aminową, zapewniający jej sztywność strukturalną. Uważa się, że szlaki wykorzystania proliny chronią komórki prątków poprzez detoksykację metyloglioksalu, toksycznego związku, który może prowadzić do uszkodzenia DNA i białek w komórkach mykobakterii (Lagautriere i wsp., 2014). Arginina należąca do grupy aminokwasów zasadowych, zawiera łańcuch boczny naładowany dodatnio. Oba aminokwasy, arginina i prolina ukierunkowane są na przemiany prowadzące do powstania α-ketoglutaranu.

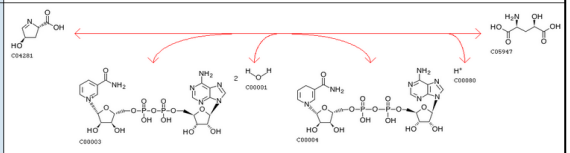


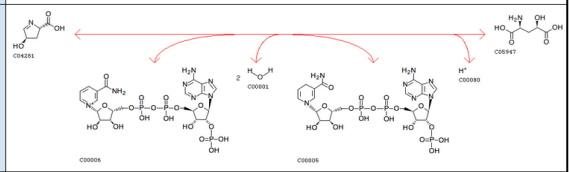
Rycina 20. Szlaki metaboliczne przemian proliny z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 27. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm argininy i proliny zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm argininy i proliny

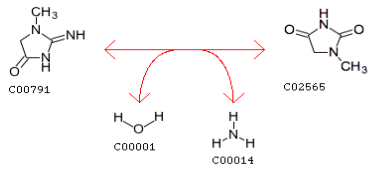
M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_5119 (pruA)	Rv1187	Dehydrogenaza 1-pirolino-5-karboksylanowa	-	- 6,26	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R04444 Reaction
Name	L-1-pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate:NAD+ oxidoreductase
Definition	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate + NAD+ + 2 H2O <=> L-erythro-4-Hydroxyglutamate + NADH + H+
Equation	C04281 + C00003 + 2 C00001 <=> C05947 + C00004 + C00080
	
Comment	possibly two-step reaction (R04443+R05051) NADPH (see R04445)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00255 C04281_C05947
Enzyme	1.2.1.88
Pathway	rn00330 Arginine and proline metabolism rn01100 Metabolic pathways

Entry	R04445 Reaction
Name	L-1-pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate:NADP+ oxidoreductase
Definition	L-1-Pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate + NADP+ + 2 H2O <=> L-erythro-4-Hydroxyglutamate + NADPH + H+
Equation	C04281 + C00006 + 2 C00001 <=> C05947 + C00005 + C00080
	
Comment	possibly two-step reaction NADH (see R04444)
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00255 C04281_C05947
Enzyme	1.2.1.88
Pathway	rn00330 Arginine and proline metabolism rn01100 Metabolic pathways

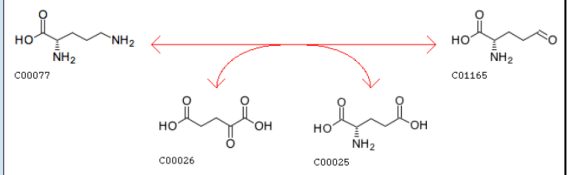
Enzym: EC 1.2.1.88
- dehydrogenaza L-glutaminianu gamma-semialdehydu
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian 5-semialdehyd
  - NAD+
  - H_2O
- produkty:
  - L-glutaminian
  - NADH
  - H+

MSMEG_4687	-	Deaminaza cytozynowa	-	- 8,56	0,1% mc2 vs 2% mc2
			7,32	-	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R02922 Reaction
Name	Creatinine iminohydrolase
Definition	Creatinine + H2O <=> N-Methylhydantoin + Ammonia
Equation	C00791 + C00001 <=> C02565 + C00014
	
Reaction class	RC00809 C00791_C02565
Enzyme	3.5.4.21
Pathway	rn00330 Arginine and proline metabolism rn01100 Metabolic pathways

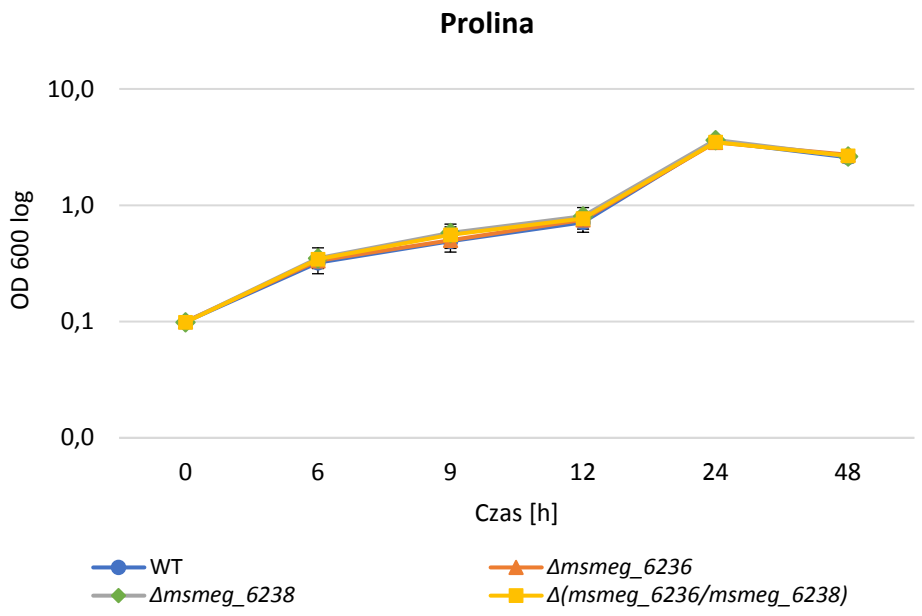
Enzym: EC 3.5.4.21
- deaminaza kreatyniny
- hydrolaza
- substraty:
  - kreatynina
  - H_2O
- produkty:
  - N-metylohydantoina
  - NH_3

MSMEG_1413 (rocD)	-	Transaminaza ornitynowo-oksokwasowa	15,48	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

Entry	R00667 Reaction
Name	L-Ornithine:2-oxo-acid aminotransferase
Definition	L-Ornithine + 2-Oxoglutarate <=> L-Glutamate 5-semialdehyde + L-Glutamate
Equation	C00077 + C00026 <=> C01165 + C00025
	
Reaction class	RC00006 C00025_C00026 RC00062 C00077_C01165
Enzyme	2.6.1.13
Pathway	rn00330 Arginine and proline metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites

Enzym: EC 2.6.1.13
- aminotransferaza ornityny
- transferaza
- substraty:
  - L-ornityna
  - 2-okso karboksylan
- produkty:
  - L-glutaminian 5-semialdehyd
  - L-aminokwas

W związku z odnotowaną zmianą poziomu ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm proliny w szczepie pozbawionym funkcjonalnego systemu MnoSR postanowiono sprawdzić zdolność szczepu mutanta do wykorzystania proliny jako jedynego źródła węgla (**Rycina 20.**). W tym celu przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepu „dzikiego" oraz mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) w obecności proliny (**Rycina 21.**), w stężeniu końcowym 0,5 % v/v. Hodowle wszystkich badanych szczepów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.21**.

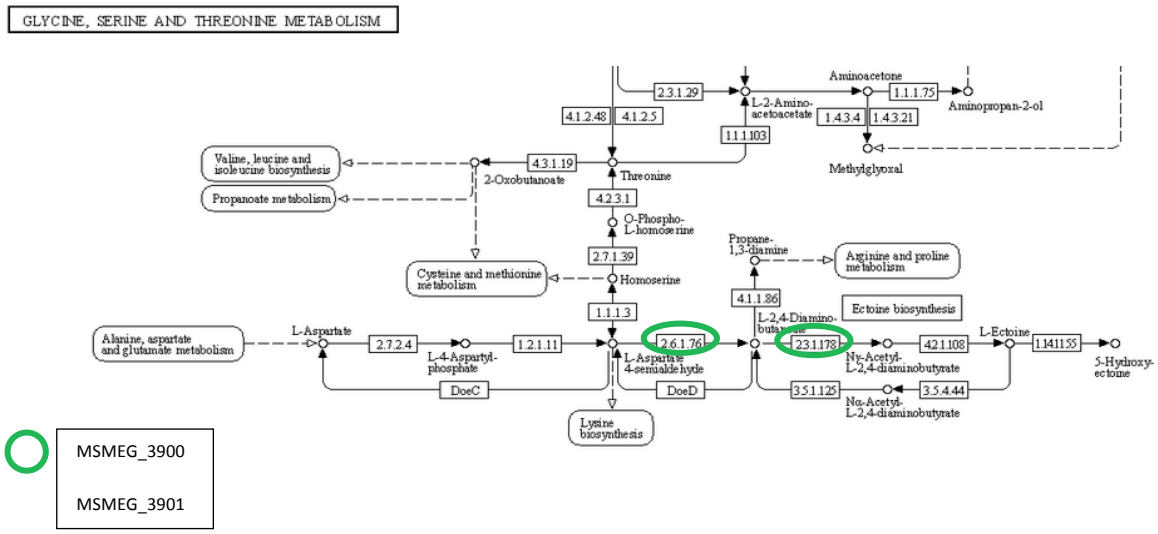


Rycina 21. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem proliny. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała, że badane szczepy mają zdolność do metabolizowania proliny jako jedynego źródła węgla, uzyskując w 48 godzinie eksperymentu wartość współczynnika gęstości optycznej około 2,7. Nie zaobserwowano różnic w kinetyce wzrostu badanych szczepów (**Rycina 21.**).

Metabolizm glicyny, seryny i treoniny

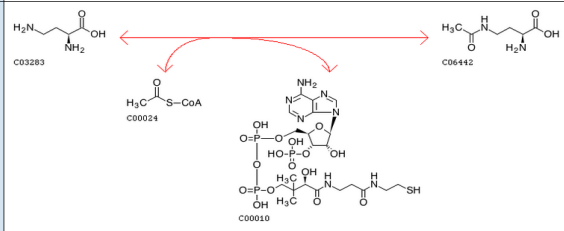
Polarne aminokwasy pozbawione ładunku tj. seryna i treonina zawierające w łańcuchach bocznych grupy hydroksylowe, uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych. Aminokwasy te mogą ulegać fosforylacji, co ma kluczowe znaczenie dla fizjologii i patogenezie bakterii oraz regulacji zachodzących w komórce mechanizmów wykrywania i reagowania na zmiany środowiskowe (Sherman i Grundner, 2014).



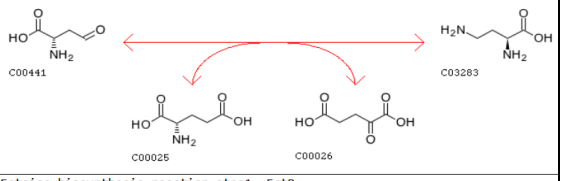
Rycina 22. Szlaki metaboliczne przemian proliny z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. ○ – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 28. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm glicyny, seryny i treoniny zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm glicyny, seryny i treoniny					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_3901 (ectA)	-	Acetylotransferaza kwasu L-2,4-diaminomasłowego	-	- 12,96	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			-	- 12,98	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
			Enzym: EC 2.3.1.178 - acetylotransferaza diaminomaślanu - transferaza - substraty: acetylo-CoA L-2,4-diaminobutanian - produkty: CoA (2S)-4-acetamido-2 aminobutanian		

Entry	R06978 Reaction
Name	acetyl-CoA:L-2,4-diaminobutanoate N4-acetyltransferase
Definition	L-2,4-Diaminobutanoate + Acetyl-CoA <=> N(gamma)-Acetyldiaminobutyrate + CoA
Equation	C03283 + C00024 <=> C06442 + C00010
	
Comment	Ectoine biosynthesis reaction step2, EctA
Reaction class	RC00004 C00010_C00024 RC00096 C03283_C06442
Enzyme	2.3.1.178
Pathway	rn00260 Glycine, serine and threonine metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

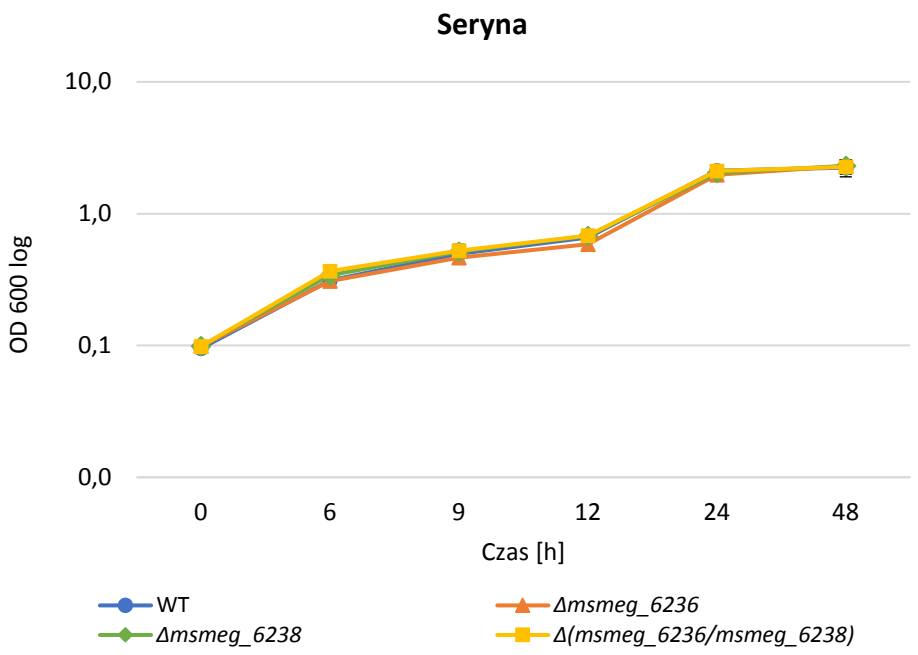
MSMEG_3900 (ectB)	-	Diaminomaślan - aminotransferaza 2-oksoglutaranowa	-	- 10,28	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			-	- 8,26	0,1% G mc2 vs 2% G mc2

Entry	R06977 Reaction
Name	L-2,4-diaminobutyrate:2-oxoglutarate 4-aminotransferase
Definition	L-Glutamate + L-Aspartate 4-semialdehyde <=> 2-Oxoglutarate + L-2,4-Diaminobutanoate
Equation	C00025 + C00441 <=> C00026 + C03283
	
Comment	Ectoine biosynthesis reaction step1, EctB
Reaction class	RC00006 C00025_C00026 RC00062 C00441_C03283
Enzyme	2.6.1.76
Pathway	rn00260 Glycine, serine and threonine metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

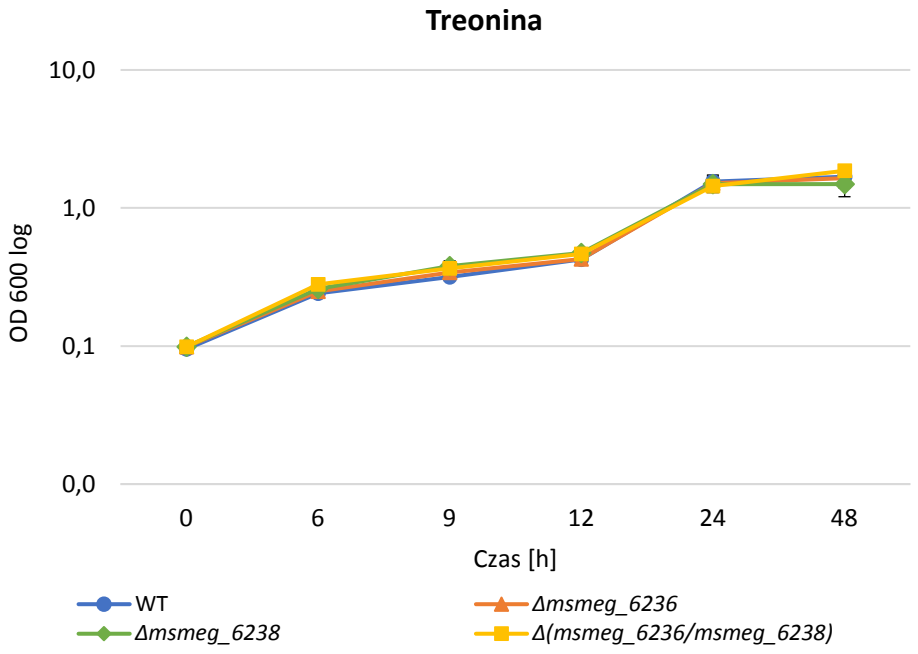
Enzym: EC 2.6.1.76
- transaminaza diaminomaślanu --- 2-oksoglutaranu
- transferaza
- substraty:
  - L-2,4-diaminobutanian
  - 2-oksoglutaran
- produkty:
  - L-asparaginian 4-semialdehyd
  - L-glutaminian

Ze względu na obserwowane różnice w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy metabolizmu seryny i treoniny postanowiono zbadać zdolność szczepu kontrolnego oraz mutantów pozbawionych funkcjonalnego systemy MnoSR do wykorzystania tych aminokwasów jako jedynych źródeł węgla (**Rycina 22.**).

W tym celu przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepu „dzikiego” oraz mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) w obecności seryny (**Rycina 23.**) oraz treoniny (**Rycina 24.**), w stężeniu końcowym 0,5 % v/v. Hodowle wszystkich badanych szczepów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.21**.



Rycina 23. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem seryny. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.



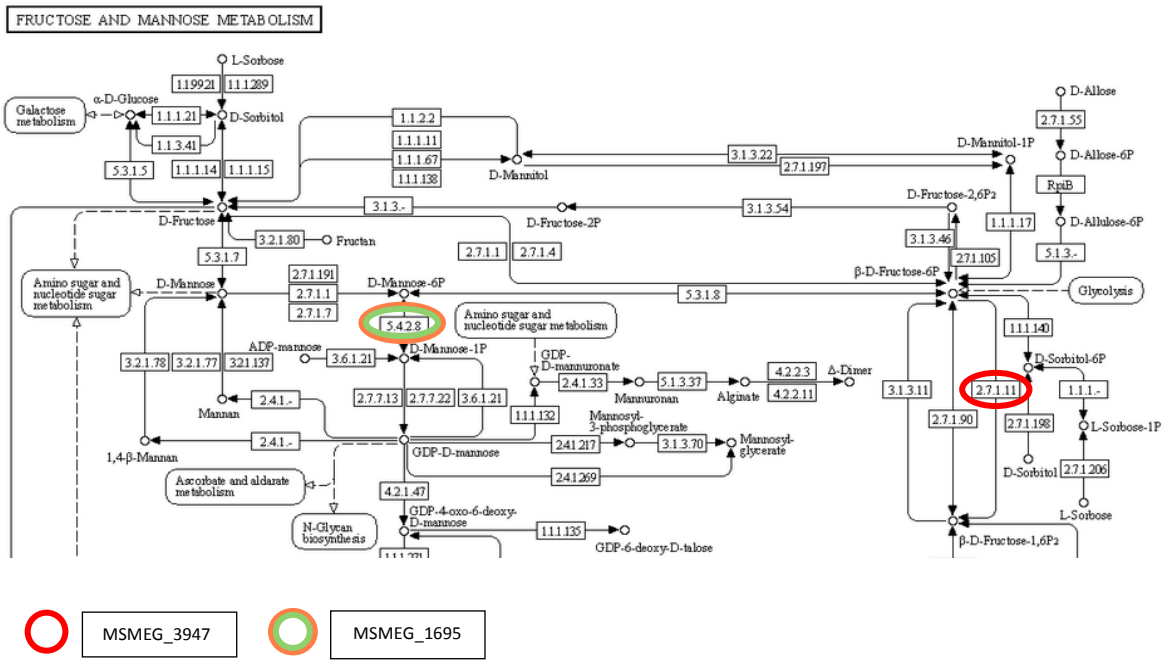
Rycina 24. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem treoniny. WT – szczep wyjściowy „dziki”, Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała, iż zarówno szczep kontrolny jak i mutanty Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) posiadają zdolność do metabolizowania seryny jako jedynego źródła węgla, uzyskując w 48 godzinie eksperymentu wartość współczynnika gęstości optycznej około 2,3. Jednocześnie nie zaobserwowano różnic w kinetyce wzrostu badanych szczepów (**Rycina 23.**).

Zastosowanie w tych samych warunkach jako źródła węgla i energii treoniny, również wskazuje na zdolność badanych szczepów do metabolizowania tego związku przez *M. smegmatis* (**Rycina 24.**).

Metabolizm fruktozy i mannozy

Fruktoza zaliczana jest do grupy ketoheksoz zawierających grupę ketonową, natomiast mannoza zaliczana jest do grupy aldoheksoz, zawierających grupę aldehydową. Oba cukry są względem siebie izomerami. Obecność grup aldehydowych lub ketonowych sprawia, iż węglowodany wykazują reakcje charakterystyczne dla aldehydów bądź ketonów. Grupa aldehydowa ulega utlenieniu, do grupy karboksylowej, a fruktoza w środowisku alkalicznym izomeryzuje do aldozy tj. glukozy.

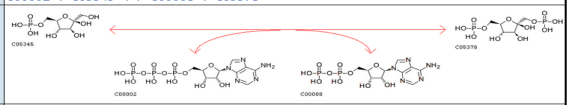


Rycina 25. Szlaki metaboliczne przemian mannozy i fruktozy z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 29. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm fruktozy i mannozy zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm fruktozy i mannozy

M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_3947	Rv2029c	Izozym 6-fosfofruktokinazy 2	8,86	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
MSMEG_1695	Rv3308	Fosfoglukomutaza/ fosfomannomutaza	10,26	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			6,66	-	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G + 2% P mc2
			-	- 6,3	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

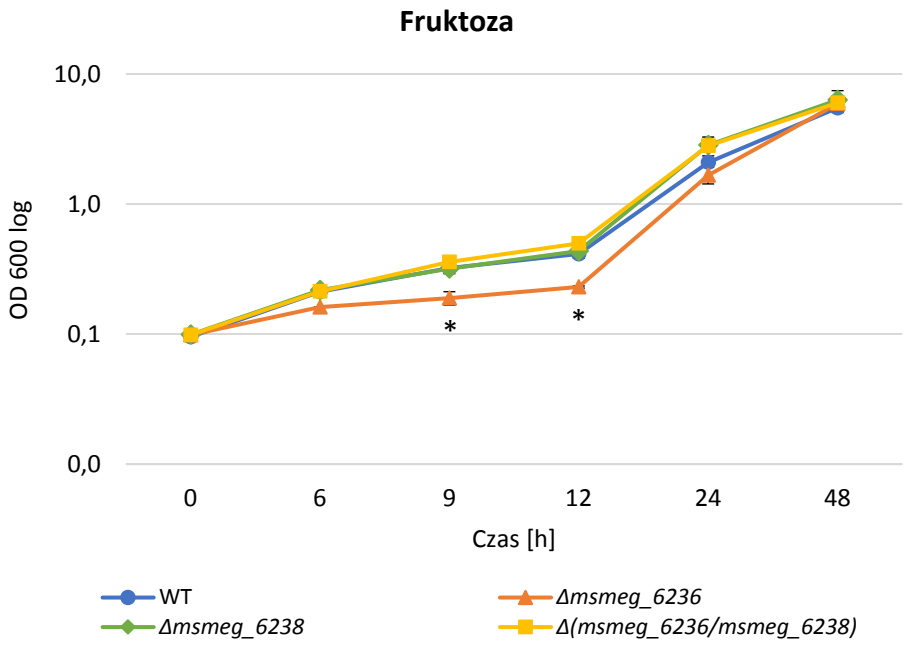
Entry	R04779 Reaction
Name	ATP:D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase
Definition	ATP + beta-D-Fructose 6-phosphate <=> ADP + beta-D-Fructose 1,6-bisphosphate
Equation	C00002 + C05345 <=> C00008 + C05378
	
Reaction class	RC00002 C00002_C00008 RC00017 C05345_C05378
Enzyme	2.7.1.11
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00030 Pentose phosphate pathway rn00051 Fructose and mannose metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 2.7.1.11
- 6-fosfofruktokinaza
- transferaza
- substraty:
  - ATP
  - beta-D-fruktofuranozo-6-fosforan
- produkty:
  - ADP
  - 1,6-bisfosforan beta-D-fruktofuranozy

Entry	R01818 Reaction
Name	D-mannose 6-phosphate 1,6-phosphomutase
Definition	D-Mannose 6-phosphate <=> D-Mannose 1-phosphate
Equation	C00275 <=> C00636
Comment	intermediate (see [CPD:C03693])
Reaction class	RC00408 C00275_C00636
Enzyme	5.4.2.8
Pathway	rn00051 Fructose and mannose metabolism rn00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism rn00541 O-Antigen nucleotide sugar biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01240 Biosynthesis of cofactors rn01250 Biosynthesis of nucleotide sugars

Enzym: EC 5.4.2.8
- fosfomannomutaza
- izomeraza
- substraty:
  1-fosforan alfa-D-mannozy
- produkty:
  6-fosforan D-mannozy

Z uwagi na odnotowane zmiany poziomu ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm fruktozy, postanowiono sprawdzić czy szczep mutant będzie wykazywał różnice w zdolności do pozyskiwania fruktozy jako jedynego źródła węgla (**Rycina 25.**). W tym celu przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepu „dzikiego" oraz mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) w obecności fruktozy (**Rycina 26.**), w stężeniu końcowym 0,5 % v/v. Hodowle wszystkich badanych szczepów prowadzono w podłożu Middlebrook 7H9 wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.20**.



Rycina 26. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu 7H9 z dodatkiem fruktozy. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech

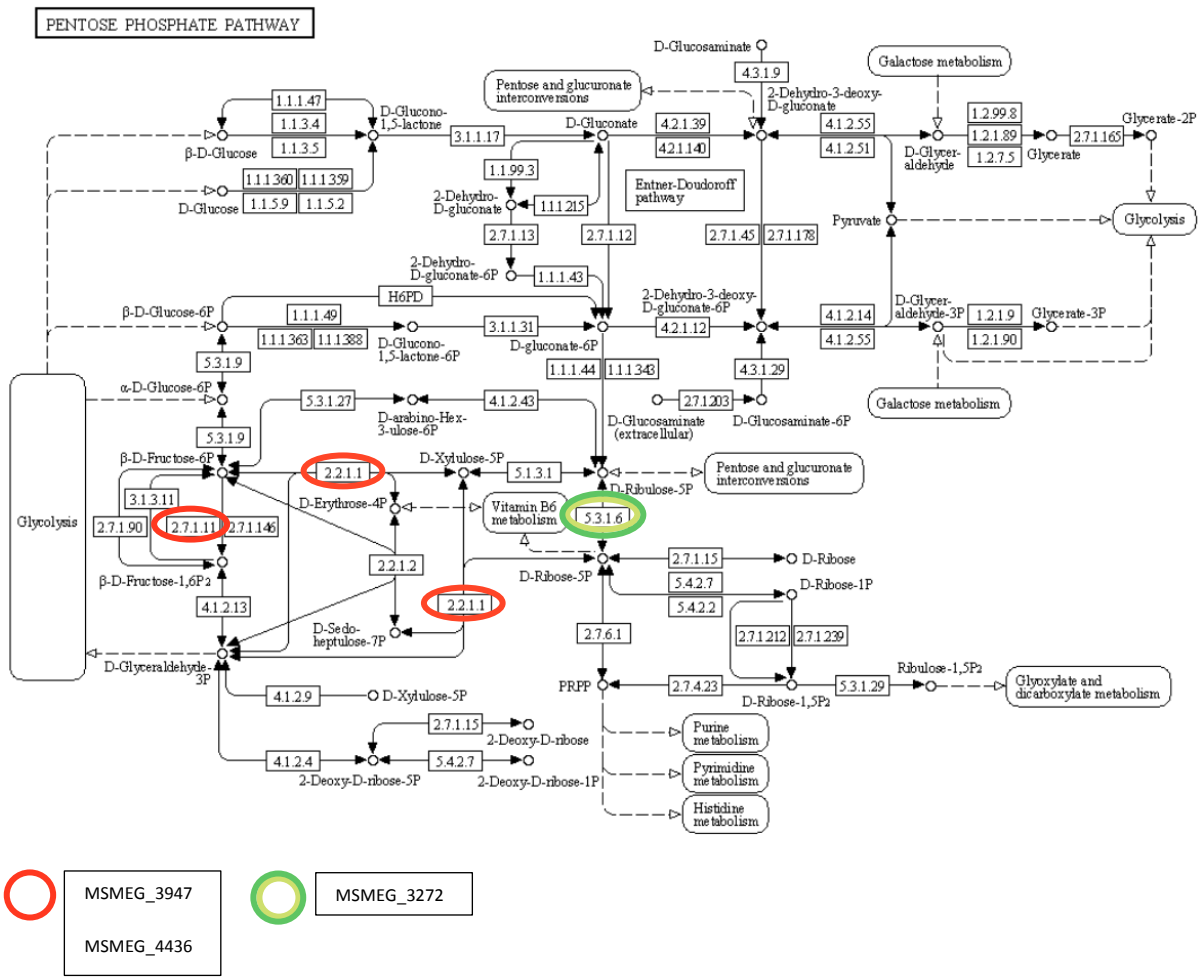
biologicznych powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta (*$p \leq 0{,}05$).

Analiza kinetyki wzrostu szczepu dzikiego mc^2 155 oraz szczepów mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*) w obecności fruktozy wykazała, iż badane szczepy wykorzystują fruktozę jako źródło węgla (**Rycina 26.**).

Przeprowadzone analizy wykazały istotne statystycznie różnice w kinetyce wzrostu szczepu Δ*msme_6236* w 9 i 12 godzinie eksperymentu, wskazujące na spowolnienie tempa wzrostu mutanta w porównaniu do pozostałych szczepów (**Rycina 26.**). W 48 godzinie eksperymentu nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w kinetyce wzrostu badanych szczepów (**Rycina 26.**).

Szlak pentozofosforanowy

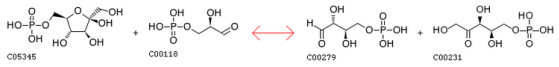
Szlak pentozofosforanowy, składający się z dwóch faz, pierwszej oksydacyjnej oraz drugiej nieoksydacyjnej, jest mechanizmem przetwarzania glukozy, którego głównym celem jest dostarczenie komórce zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego ($NADPH+H^+$) oraz rybulozo-5-fosforanu. W przeciwieństwie do procesu glikolizy lub cyklu kwasów trikarboksylowych, stanowiących procesy o określonych kierunkach przemian, w szlaku pentozofosforanowym metabolizm cukrów, może zachodzić w różnych kierunkach, a szybkość oraz kierunek tych reakcji zależy od dostępności substratu lub zapotrzebowania na dane metabolity tego szlaku. Generowane podczas przemian zachodzących w ramach szlaku pentozofosforanowego cząsteczki NADH, pełnią rolę reduktora licznych procesów biosyntezy, m.in. biosyntezy kwasów tłuszczowych, natomiast rybulozo-5-fosforan jest niezbędny do biosyntezy nukleotydów wchodzących w skład kwasów nukleinowych.



Rycina 27. Szlak pentozofosforanowy z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 30. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących szlak pentozofosforanowy zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Szlak pentozofosforanowy					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_4436	-	Transketolaza	4,00	-	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G Δ6236/6238
			Enzym: EC 2.2.1.1 - transketolaza - transferaza - substraty: 7-fosforan sedoheptulozy 3-fosforan D-gliceraldehydu - produkty: 5-fosforan D-rybozy 5-fosforan D-ksylulozy		

Entry	R01830 Reaction
Name	beta-D-Fructose 6-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycolaldehyde transferase
Definition	beta-D-Fructose 6-phosphate + D-Glyceraldehyde 3-phosphate <=> D-Erythrose 4-phosphate + D-Xylulose 5-phosphate
Equation	C05345 + C00118 <=> C00279 + C00231
	
Reaction class	RC00032 C00118_C00231 RC00226 C00279_C05345
Enzyme	2.2.1.1
Pathway	rn00030 Pentose phosphate pathway rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

Entry	R01641 Reaction
Name	sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycolaldehyde transferase
Definition	Sedoheptulose 7-phosphate + D-Glyceraldehyde 3-phosphate <=> D-Ribose 5-phosphate + D-Xylulose 5-phosphate
Equation	C05382 + C00118 <=> C00117 + C00231
Comment	TPP-dependent enzyme (see R06863+R06861)
Reaction class	RC00032 C00118_C00231 RC00571 C00117_C05382
Enzyme	2.2.1.1
Pathway	rn00030 Pentose phosphate pathway rn00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

MSMEG_3947	-	Izozym 6-fosfofruktokinazy 2	8,86	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
MSMEG_3272	-	Izomeraza rybozo-5-fosforanowa	-	- 5,42	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2
			-	- 9,02	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R01056 Reaction
Name	D-ribose-5-phosphate aldose-ketose-isomerase
Definition	D-Ribose 5-phosphate <=> D-Ribulose 5-phosphate
Equation	C00117 <=> C00199
Reaction class	RC00434 C00117_C00199
Enzyme	5.3.1.6
Pathway	rn00030 Pentose phosphate pathway rn00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

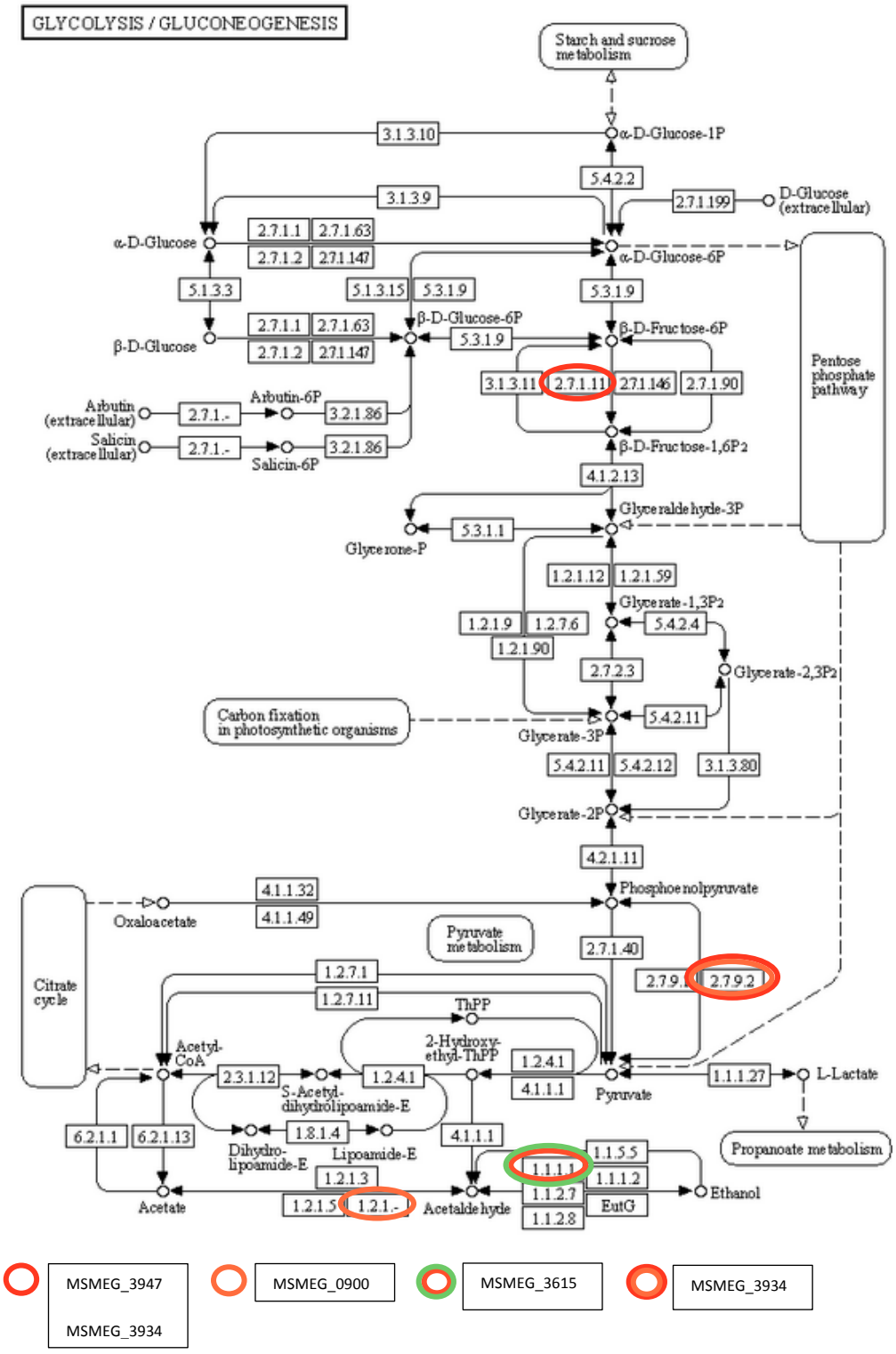
Enzym: EC 5.3.1.6
- izomeraza rybozo-5-fosforanowa
- izomerazy
- substraty:
  5-fosforan D-rybozy
- produkty:
  5-fosforan D-rybulozy

Analiza transkryptomiczna szczepów hodowanych w warunkach niedoboru węgla wykazała obniżony poziom ekspresji genu *msmeg_3272*, kodującego enzym izomerazę rybozo-5-fosforanową u szczepu mutanta (**Tabela 30.**).

Glikoliza / Glukoneogeneza

Proces glikolizy stanowi łańcuch reakcji prowadzący do przekształcenia glukozy w pirogronian, z jednoczesnym wytworzeniem stosunkowo niewielkich ilości ATP. Na glikolizę składają się reakcje przeniesienia grupy fosforanowej z ATP na związek pośredni (intermediat) lub z intermediatu na ADP przy udziale kinazy, reakcja przesunięcia fosforanu

z udziałem mutazy przemieszczającej grupę fosforanową w obrębie atomów tlenu jednej cząsteczki, reakcja izomeryzacji, w której pod wpływem izomerazy ketoza ulega przekształceniu w aldozę lub odwrotnie, reakcja dehydratacji, w której dochodzi do odłączenia cząsteczki wody przez dehydrogenazę oraz reakcje rozszczepienia, w których pod wpływem aldolazy dochodzi do rozerwania wiązania węgiel-węgiel. W procesie glukoneogenezy pirogronian zostaje przekształcony do glukozy na drodze przemian prekursorów, nie będących cukrowcami – mleczanu, aminokwasów i glicerolu.

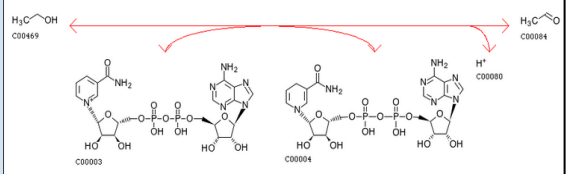


Rycina 28. Szlaki przemian metabolicznych glikolizy i glukoneogenezy, z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 31. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących procesy glikolizy i glukoneogenezy zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

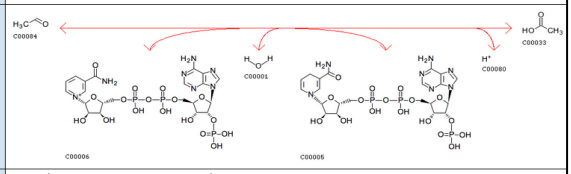
Glikoliza / Glukoneogeneza

M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_3615	Rv1862	Białko rodziny dehydrogenaz alkoholowych wiążących cynk	7,22	-	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G + 2% P mc^2
				- 8,14	0,1% G + 2% P mc^2 vs 0,1% G mc^2

Entry	R00754 Reaction
Name	ethanol:NAD+ oxidoreductase
Definition	Ethanol + NAD+ <=> Acetaldehyde + NADH + H+
Equation	C00469 + C00003 <=> C00084 + C00004 + C00080
	
Comment	NADP+ (ec 1.1.1.71, see R00746)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00088 C00084_C00469
Enzyme	1.1.1.1 1.1.1.71
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

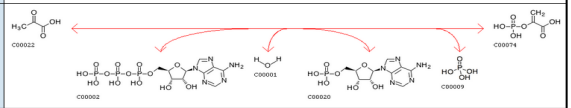
Enzym: EC 1.1.1.1
- dehydrogenaza alkoholowa (ADH)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - alkohol pierwszorzędowy
  - NAD+
  - alkohol drugorzędny
- produkty:
  - aldehyd
  - NADH
  - H+
  - keton

MSMEG_0900	-	Dehydrogenaza aldehydowa indukowana eptc	11,88	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

Entry	R00711 Reaction
Name	Acetaldehyde:NADP+ oxidoreductase
Definition	Acetaldehyde + NADP+ + H2O <=> Acetate + NADPH + H+
Equation	C00084 + C00006 + C00001 <=> C00033 + C00005 + C00080
	
Comment	NAD+ (ec 1.2.1.5, see R00710)
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00047 C00033_C00084
Enzyme	1.2.1.4 1.2.1.5 1.2.1.-
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.2.1.-
- dehydrogenaza aldehydowa indukowana eptc
- oksydoreduktaza

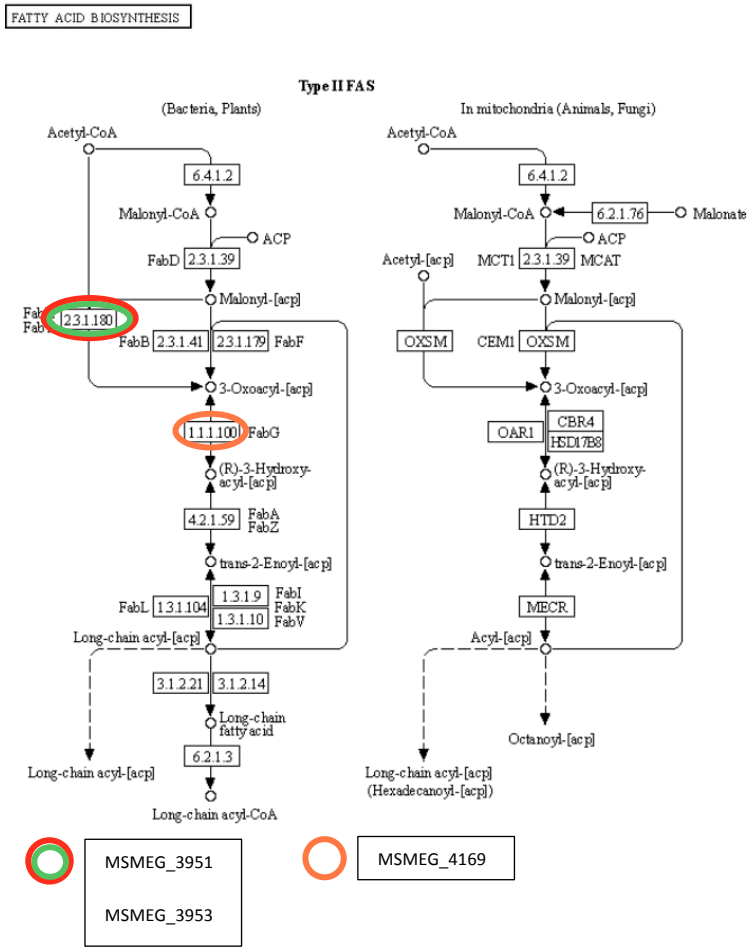
MSMEG_3947	-	Izozym 6-fosfofruktokinazy 2	8,86	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
MSMEG_3934	-	Syntaza fosfoenolopirogronianowa	10,5	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
			6,58	-	0,1% G + 2% P mc^2 vs 0,1% G mc^2

Entry	R00199 Reaction
Name	ATP:pyruvate,water phosphotransferase
Definition	ATP + Pyruvate + H2O <=> AMP + Phosphoenolpyruvate + Orthophosphate
Equation	C00002 + C00022 + C00001 <=> C00020 + C00074 + C00009
	
Comment	multi-step reaction
Reaction class	RC00002 C00002_C00020 RC00015 C00022_C00074
Enzyme	2.7.9.2
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn00680 Methane metabolism rn00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism

Enzym: EC 2.7.9.2
- pirogronian, dikinaza wodna
- transferaza
- substraty:
  - ATP
  - pirogronian
  - H_2O
- produkty:
  - AMP
  - fosfoenolopirogronian
  - fosforan

Biosynteza kwasów tłuszczowych

Kwasy tłuszczowe zbudowane z długiego, węglowodorowego łańcucha zakończonego grupą karboksylową podlegają procesowi syntezy, która obejmuje kondensacje jednostek dwuwęglowych w postaci acetylo-CoA, co prowadzi do powstania długich łańcuchów węglowodorowych z wykorzystaniem kompleksów enzymatycznych oraz NADPH jako związku redukującego. Kwasy tłuszczowe są ważnymi składnikami błon komórkowych, stanowiąc materiał budulcowy fosfo- i glikolipidów, tworzą kowalencyjne wiązania z białkami, prowadząc do ich modyfikacji, a także stanowią materiał energetyczny.

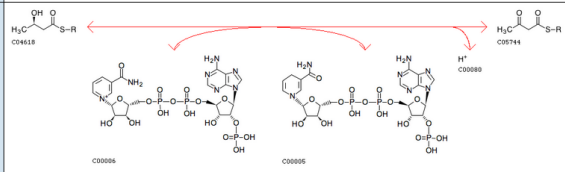


Rycina 29. Szlaki przemian metabolicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych, z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

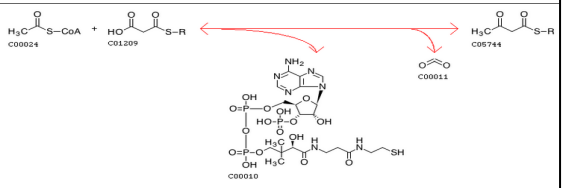
Tabela 32. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących proces biosyntezy kwasów tłuszczowych zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Biosynteza kwasów tłuszczowych

M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_4169	-	Reduktaza 3-oksoacylo-[acyl-nośnik-białko]	10,76	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
MSMEG_3953	-	Hipotetyczne białko konserwatywne	8,42	-	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2
			-	- 10,86	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G + 2% P mc2
			10,28	-	2% G Δ6236/6238 vs 2% G mc2
MSMEG_3951	-	Hipotetyczne białko konserwatywne	9,36	-	
			-	- 9,6	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			-	- 13,62	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G + 2% P mc2
			10,54	-	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

Entry	R04533 Reaction
Name	(3R)-3-hydroxybutanoyl-[acyl-carrier protein]:NADP+ oxidoreductase
Definition	(3R)-3-Hydroxybutanoyl-[acyl-carrier protein] + NADP+ <=> Acetoacetyl-[acp] + NADPH + H+
Equation	C04618 + C00006 <=> C05744 + C00005 + C00080
	
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00117 C04618_C05744
Enzyme	1.1.1.100 1.1.1.- 2.3.1.85 2.3.1.86 2.3.1.-
Pathway	rn00061 Fatty acid biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01212 Fatty acid metabolism

Enzym: EC 1.1.1.100
- reduktaza 3-oksoacylo-[acyl-nośnik-białko]
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - (3R)-3-hydroksyacylo-[białko-nośnik acylu]
  - NADP+
- produkty:
  - 3-oksoacylo-[białko nośnikowe acylu]
  - NADPH
  - H+

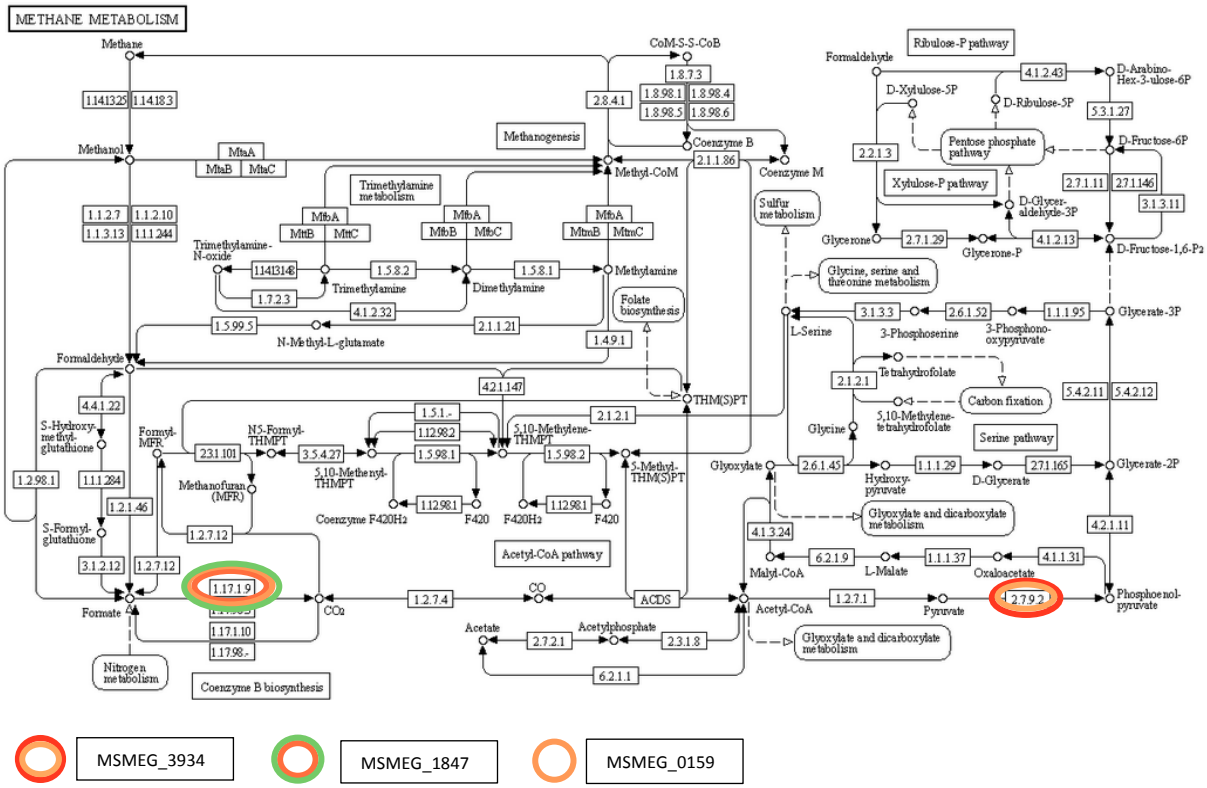
Entry	R10707 Reaction
Name	acetyl-CoA:malonyl-[acyl-carrier protein] C-acetyltransferase (decarboxylating)
Definition	Acetyl-CoA + Malonyl-[acyl-carrier protein] <=> Acetoacetyl-[acp] + CoA + CO2
Equation	C00024 + C01209 <=> C05744 + C00010 + C00011
	
Reaction class	RC00004 C00010_C00024 RC02729 C00024_C05744 RC02888 C01209_C05744
Enzyme	2.3.1.180
Pathway	rn00061 Fatty acid biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01212 Fatty acid metabolism

Enzym: EC 2.3.1.180
- beta-ketoacylo-[acylo-nośnik-białko] syntaza III (FabH)
- transferaza
- substraty:
  - acetylo-CoA
  - malonylo-[białko nośnikowe acylu]
- produkty:
  - acetoacetyl-[białko nośnikowe acylu]
  - CoA
  - CO_2

Obserwowane w szczepie „dzikim” i mutancie różnice pomiędzy ekspresją genów *msmeg_3953* i *msmeg_3951* wchodzących w skład wspólnego operonu i kodujących enzym FabH, wynikają prawdopodobnie z roli MSMEG_6236/MSMEG _6238 w regulacji określonych procesów metabolicznych w komórce w obecności glukozy, a nie z różnic w zdolności do wykorzystania obecnego w podłożu źródła węgla (**Tabela 32.**).

Metabolizm metanu

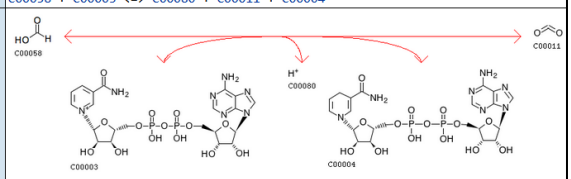
Metan, wykorzystywany przez niektóre bakterie jako jedno ze źródeł węgla i energii ulega przemianom regulowanym przez enzym monooksygenazę metanu, która katalizuje hydroksylację metanu do metanolu, oraz enzymy zaangażowane w wiązanie formaldehydu poprzez szlak monofosforanu rybozy (van Spanning i wsp., 2022).



Rycina 30. Szlaki przemian metabolicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych, z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

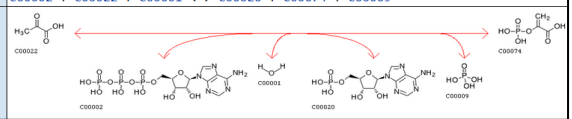
Tabela 33. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm metanu, zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm metanu					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_1847	-	Ferredoksyna 4Fe-4S, białko wiążące żelazo i siarkę	11,68	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			17,1	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
			7,54	-	0,1% G + 2% P Δ6236/6238 vs 0,1% G + 2% P mc2
			-	- 7,74	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2
MSMEG_0159	-	Dehydrogenaza mrówczanowa, podjednostka gamma	4,04	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2

Entry	R00519 Reaction
Name	formate:NAD+ oxidoreductase
Definition	Formate + NAD+ <=> H+ + CO2 + NADH
Equation	C00058 + C00003 <=> C00080 + C00011 + C00004
	
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC02796 C00011_C00058
Enzyme	1.17.1.9
Pathway	rn00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism rn00680 Methane metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism

Enzym: EC 1.17.1.9 (wcześniej jako EC 1.2.1.2)
- dehydrogenaza mrówczanowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - mrówczan
  - NAD+
- produkty:
  - CO_2
  - NADH

MSMEG_3934	-	Syntaza fosfoenolopirogronianowa	10,5	-	2% 6236/8 vs 2% mc2
			6,58	-	0,1% G + 2% P mc2 vs 0,1% G mc2

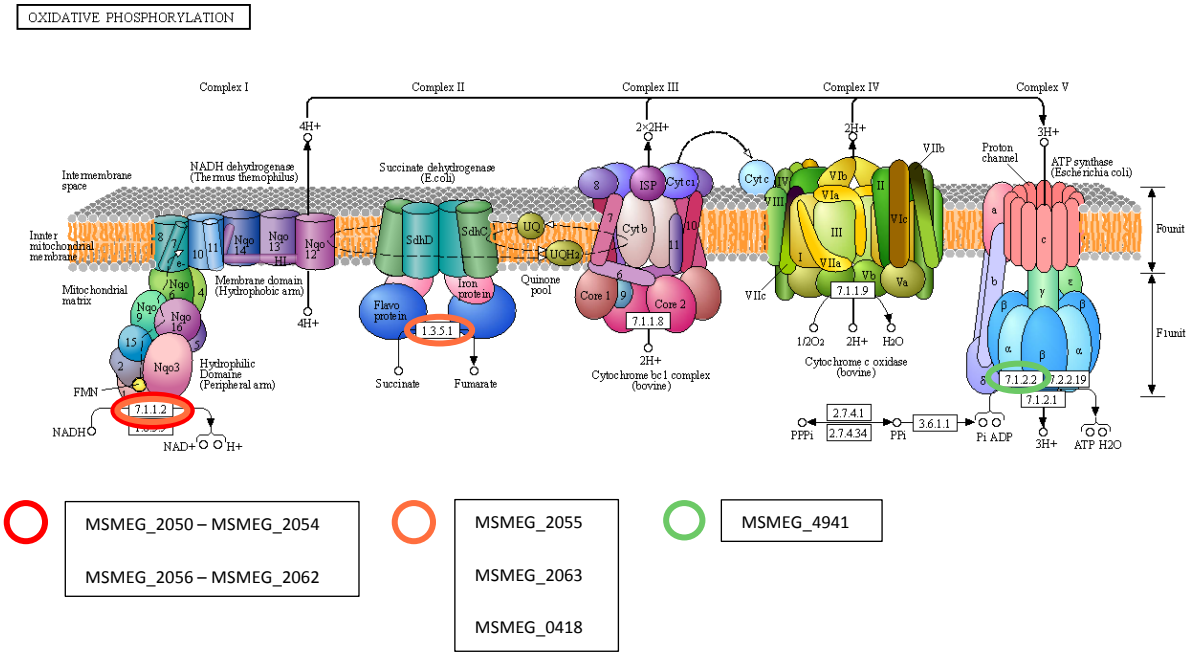
Entry	R00199 Reaction
Name	ATP:pyruvate,water phosphotransferase
Definition	ATP + Pyruvate + H2O <=> AMP + Phosphoenolpyruvate + Orthophosphate
Equation	C00002 + C00022 + C00001 <=> C00020 + C00074 + C00009
	
Comment	multi-step reaction
Reaction class	RC00002 C00002_C00020 RC00015 C00022_C00074
Enzyme	2.7.9.2
Pathway	rn00010 Glycolysis / Gluconeogenesis rn00620 Pyruvate metabolism rn00680 Methane metabolism rn00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism

Enzym: EC 2.7.9.2
- pirogronian, dikinaza wodna
- transferaza
- substraty:
  - ATP
  - pirogronian
  - H_2O
- produkty:
  - AMP
  - fosfoenolopirogronian
  - fosforan

Obserwowane różnice pomiędzy szczepem „dzikim” i mutantem wynikają prawdopodobnie z roli MnoSR w regulacji metabolizmu metanu w komórce *M. smegmatis*, zarówno w warunkach niedoboru węgla, jak i w obecności glukozy. W pierwszym przypadku, u mutanta zaobserwowano wyższy poziom ekspresji genu *msmeg_3934* kodującego enzym transferazę tj. syntetazę fosfoenolopirogronianową (**Tabela 33.**). Natomiast, w warunkach niedoboru węgla u mutanta obserwowano zwiększoną ekspresję genu *msmeg_0159* kodującego enzym dehydrogenazę mrówczanową (**Tabela 33.**).

Fosforylacja oksydacyjna

Fosforylacja oksydacyjna dotyczy syntezy ATP (fosforylacji) zachodzącej podczas utleniania (oksydacji) NADH i $FADH_2$ do NAD^+ oraz FAD, z wykorzystaniem transportu elektronów przez łańcuch oddechowy.



Rycina 31. Szlaki przemian metabolicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych, z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 34. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących proces fosforylacji oksydacyjnej, zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Fosforylacja oksydacyjna					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_4941 (atpE)	Rv1305	Syntaza ATP F0, podjednostka C	-	- 8,66	0,1% G mc2 vs 2% G mc2

Enzym: EC 7.1.2.2 (wcześniej EC 3.6.3.14)
- syntaza ATP
- translokaza
- substraty:
  - ATP
  - H_2O
  - H+
- produkty:
  - ADP
  - fosforan
  - H+

MSMEG_2050 (nuoN)	Rv3158	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka N	16,18	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			12,52	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2051 (nuoM)	Rv3157	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka M	18,84	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			16,54	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2052 (nuoL)	Rv3156	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka L	18,86	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			18,2	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2053 (nuoK)	Rv3155	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka K	19,16	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			16,92	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2054	Rv3154	Podjednostka dehydrogenazy NADH j	18,36	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			16,88	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2056 (nuoH)	Rv3152	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka H	20,48	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			16,92	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2057 (nuoG)	Rv3151	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka G	22,18	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			19,12	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2058 (nuoF)	Rv3150	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka F	19,64	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			15,5	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
			4,8	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2
MSMEG_2059	Rv3149	Łańcuch oksydoreduktazy chinonu NADH e	20,72	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			17,9	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
			5,32	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2
MSMEG_2060 (nuoD)	Rv3148	Oksydoredukataza chinonu NADH, podjednostka D	17,82	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			14,64	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2061	Rv3147	Łańcuch oksydoreduktazy chinonu NADH c	18,22	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			14,58	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2062 (nuoB)	Rv3146	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka B	19,44	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			15,38	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2055 (nuoI)	Rv3153	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka I	15,44	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			13,54	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_2063 (nuoA)	Rv3145	Oksydoreduktaza chinonu NADH, podjednostka A	14,3	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
			15,12	-	0,1% G mc2 vs 2% G mc2

Enzym: EC 7.1.1.2 (wcześniej oznaczony jako EC 1.6.5.3)
- NADH: reduktaza ubichinonu (translokacja H+)
- translokaza
- substraty:
    NADH
    ubichinon
    H+
- produkty:
    NAD+
    ubichinol
    H+

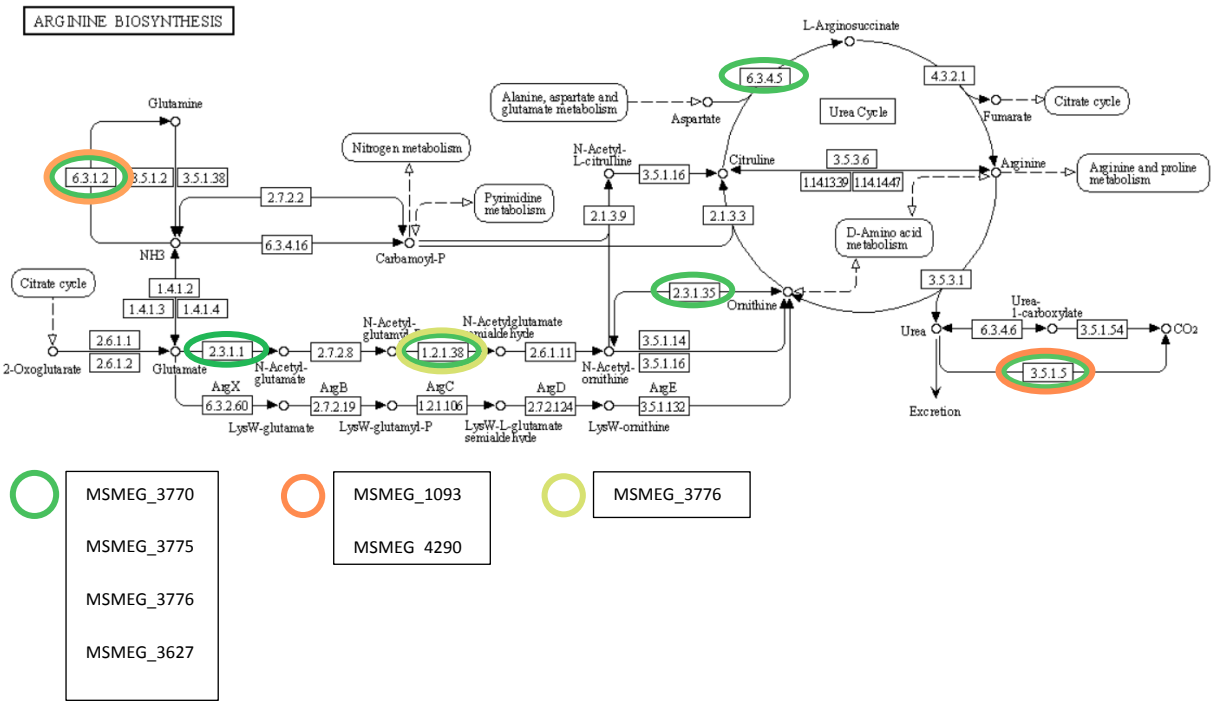
MSMEG_0418	Rv0248c	Podjednostka flawoproteiny dehydrogenazy bursztynianowej	10,34	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

Entry	R02164 Reaction
Name	succinate:quinone oxidoreductase
Definition	Quinone + Succinate <=> Hydroquinone + Fumarate
Equation	C15602 + C00042 <=> C15603 + C00122
Comment	electron transport complex II
Reaction class	RC00045 C00042_C00122
Enzyme	1.3.5.1
Pathway	rn00020 Citrate cycle (TCA cycle) rn00620 Pyruvate metabolism rn00650 Butanoate metabolism rn00720 Carbon fixation pathways in prokaryotes rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01200 Carbon metabolism

Enzym: EC 1.3.5.1
- dehydrogenaza bursztynianowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - bursztynian
  - chinon
- produkty:
  - fumaran
  - chinol

Przeprowadzona analiza transkryptomiczna wykazała silną indukcję genów regulujących przebieg procesu fosforylacji oksydacyjnej zarówno u mutanta jak i szczepu kontrolnego wynikającą z ograniczonego dostępu do źródła węgla. Nie zaobserwowano natomiast różnic wynikających bezpośrednio z obecności lub braku MnoSR (**Tabela 34.**). Wyjątkiem wydaje się być jedynie obserwowana u mutanta w warunkach głodu węglowego indukcja genu *msmeg_2059*, kodującego enzym reduktazę ubichinonu (**Tabela 34.**).

Biosynteza argininy

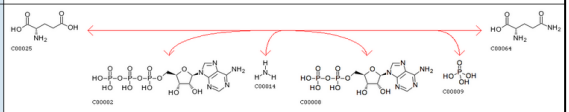


Rycina 32. Szlaki przemian metabolicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych, z uwzględnieniem enzymów regulujących ten szlak. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 35. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących proces biosyntezy argininy, zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

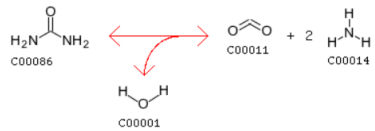
Biosynteza argininy

M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_2595	Rv2860c	Syntetaza gamma-glutamyloizopropyloamidowa	-	- 6,06	0,1% G+ 2% P mc2 vs 0,1% G mc2
MSMEG_4290 (glnA)	Rv2220c	Syntetaza glutaminy typu I	7,04	-	

Entry	R00253 Reaction
Name	L-Glutamate:ammonia ligase (ADP-forming)
Definition	ATP + L-Glutamate + Ammonia <=> ADP + Orthophosphate + L-Glutamine
Equation	C00002 + C00025 + C00014 <=> C00008 + C00009 + C00064
	
Reaction class	RC00002 C00002_C00008 RC00010 C00025_C00064 RC02798 C00014_C00064
Enzyme	6.3.1.2
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01230 Biosynthesis of amino acids

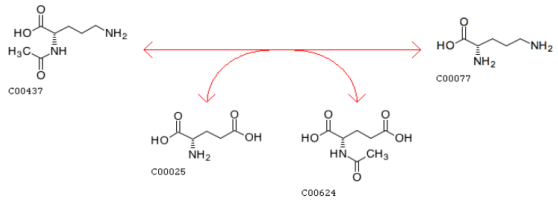
Enzym: EC 6.3.1.2
- syntetaza glutaminy
- ligaza
- substraty:
  - ATP
  - L-glutaminian
  - NH_3
- produkty:
  - ADP
  - fosforan
  - L-glutamina

MSMEG_3627 (ureA)	Rv1848	Ureaza	-	- 9,88	0,1% G mc2 vs 2% G mc2
MSMEG_1093 (speB)	-	Podjednostka gamma/beta ureazy	4,72	-	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2

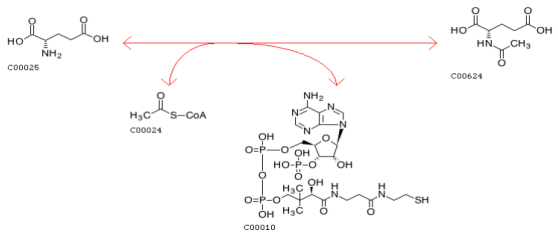
Entry	R00131 Reaction
Name	Urea amidohydrolase
Definition	Urea + H2O <=> CO2 + 2 Ammonia
Equation	C00086 + C00001 <=> C00011 + 2 C00014
	
Reaction class	RC02798 C00014_C00086 RC02806 C00011_C00086
Enzyme	3.5.1.5
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00230 Purine metabolism rn00791 Atrazine degradation rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 3.5.1.5
- ureaza
- hydrolaza
- substraty:
  - mocznik
  - H_2O
- produkty:
  - CO_2
  - NH_3

MSMEG_3775 (argJ)	Rv1653	Bifunkcjonalne białko biosyntezy argininy ArgJ	-	- 10,66	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

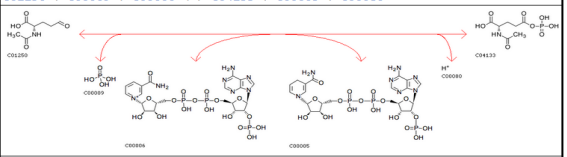
Entry	R02282 Reaction
Name	N2-Acetyl-L-ornithine:L-glutamate N-acetyltransferase
Definition	N-Acetylornithine + L-Glutamate <=> L-Ornithine + N-Acetyl-L-glutamate
Equation	C00437 + C00025 <=> C00077 + C00624
	
Reaction class	RC00064 C00025_C00624 C00077_C00437
Enzyme	2.3.1.35
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 2.3.1.35
- glutaminian N-acetylotransferazy
- transferaza
- substraty:
  N2-acetylo-L-ornityna
  L-glutaminian
- produkty:
  5-fosforan N-acetylo-L-glutamylu
  NADPH
  H+

Entry	R00259 Reaction
Name	acetyl-CoA:L-glutamate N-acetyltransferase
Definition	Acetyl-CoA + L-Glutamate <=> CoA + N-Acetyl-L-glutamate
Equation	C00024 + C00025 <=> C00010 + C00624
	
Reaction class	RC00004 C00010_C00024 RC00064 C00025_C00624
Enzyme	2.3.1.1
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

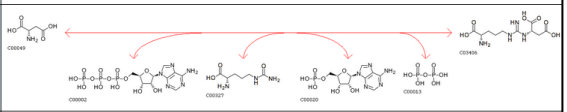
Enzym: EC 2.3.1.1
- aminokwas N-acetylotransferaza
- transferaza
- substraty:
  acetylo-CoA
  L-glutaminian
- produkty:
  CoA
  N-acetylo-L-glutaminian

MSMEG_3776 (argC)	Rv1652	Reduktaza N-acetylo-gamma-glutamylofosforanowa	-	- 12,32	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238
				- 4,44	0,1% G Δ6236/6238 vs 0,1% G mc2

Entry	R03443 Reaction
Name	N-acetyl-L-glutamate-5-semialdehyde:NADP+ 5-oxidoreductase (phosphrylating)
Definition	N-Acetyl-L-glutamate 5-semialdehyde + Orthophosphate + NADP+ <=> N-Acetyl-L-glutamate 5-phosphate + NADPH + H+
Equation	C01250 + C00009 + C00006 <=> C04133 + C00005 + C00080
	
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00684 C01250_C04133
Enzyme	1.2.1.38
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 1.2.1.38
- reduktaza N-acetylo-gamma-glutamylofosforanowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  N-acetylo-L-glutaminian 5-semialdehyd
  NADP+
  fosforan
- produkty:
  L-ornityna
  N-acetylo-L-glutaminian

MSMEG_3770 (argG)	Rv1658	Syntaza argininobursztynianu	-	- 9,64	0,1% G Δ6236/6238 vs 2% G Δ6236/6238

Entry	R01954 Reaction
Name	L-Citrulline:L-aspartate ligase (AMP-forming)
Definition	ATP + L-Citrulline + L-Aspartate <=> AMP + Diphosphate + N-(L-Arginino)succinate
Equation	C00002 + C00327 + C00049 <=> C00020 + C00013 + C03406
	
Reaction class	RC00380 C00049_C03406 RC00629 C00327_C03406
Enzyme	6.3.4.5
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 6.3.4.5
- syntaza argininobursztynianu
- ligaza
- substraty:
  ATP
  L-cytrulina
  L-asparaginian
- produkty:
  AMP
  difosforan
  2-(Nomega-L-arginino)bursztynian

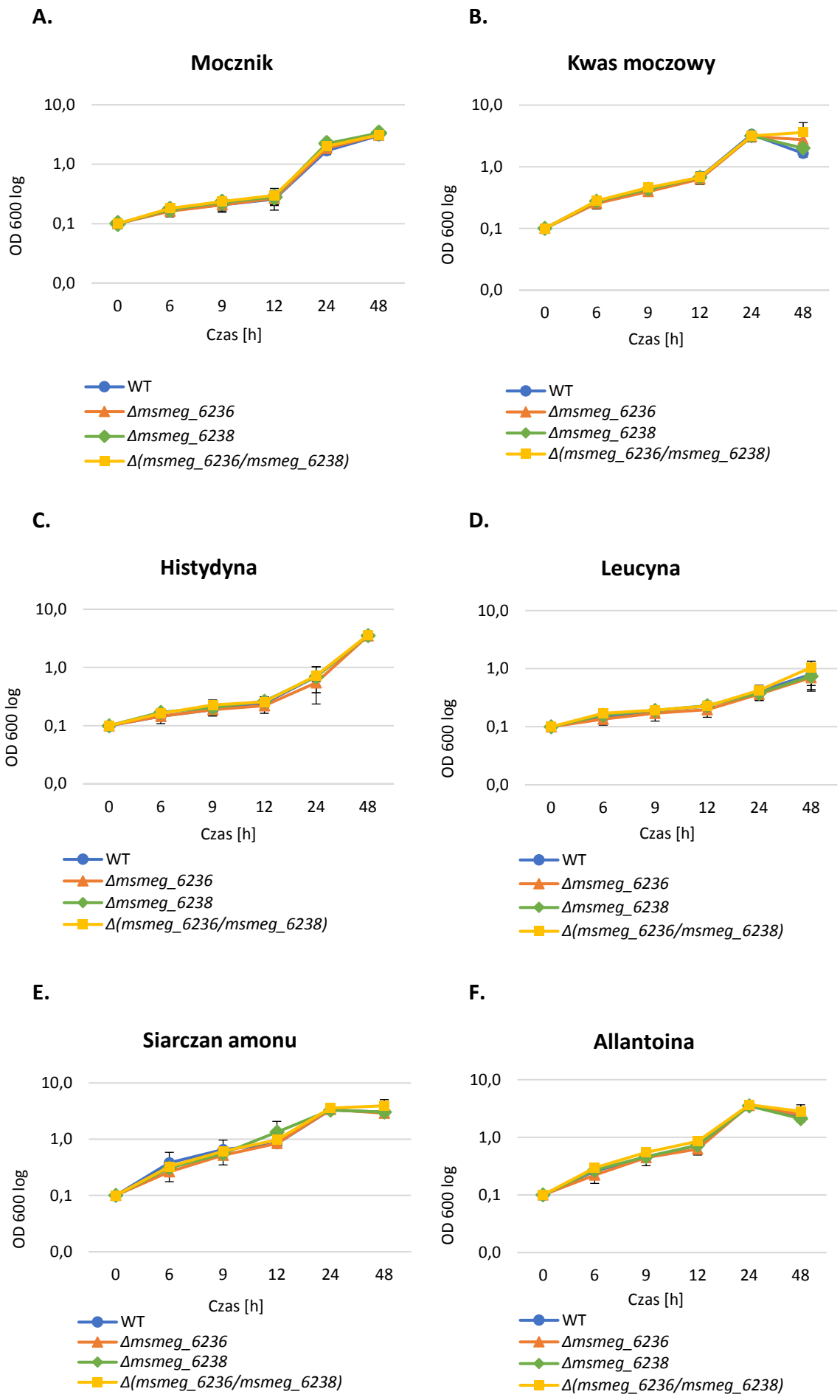
Przeprowadzona analiza transkryptomiczna dla badanych szczepów rosnących na podłożu minimalnym w warunkach niedoboru węgla, pokazała u mutanta Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238* wyższy poziom ekspresji genu *msmeg_1093*, kodującego enzym ureazę) **(Tabela 35.).**

Dodatkowo, u badanych szczepów odnotowano różnicę poziomu ekspresji genu *msmeg_3776*, kodującego reduktazę N-acetylo-gamma-glutamylofosforanową.

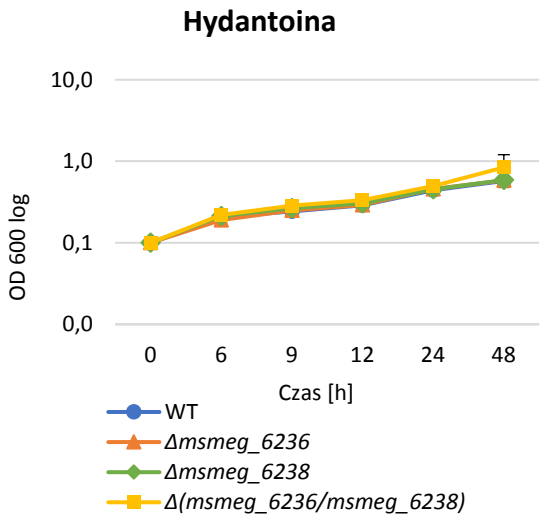
Zaobserwowane różnice w ekspresji powyższych genów u mutanta i szczepu kontrolnego wskazują na zaangażowanie systemu MnoSR w regulacji biosyntezy argininy w warunkach niedoboru węgla **(Tabela 35.)**.

5.7. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu Sauton z dodatkiem różnych źródeł azotu

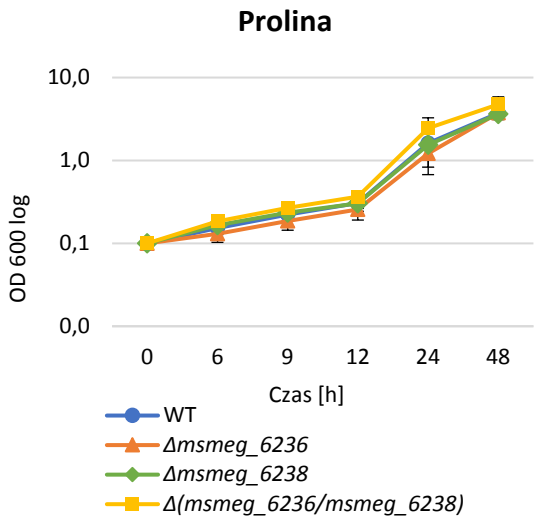
W celu zbadania potencjalnego wpływu inaktywacji genów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) na zdolność do metabolizmu związków azotowych przez prątki przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu szczepów mutantów w obecności wybranych związków azotowych stanowiących jedyne źródło azotu, w stężeniu końcowym 5 mM (acetamid, azotan sodu) lub 10 mM (alantoina, azotyn sodu, glutaminian potasu, histydyna, hydantoina, kwas moczowy, leucyna, metionina, mocznik, prolina, siarczan amonu). Hodowle szczepu kontrolnego oraz badanych mutantów prowadzono w podłożu minimalnym Sauton'a pozbawionym źródeł azotu lub z ich dodatkiem wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.20**.


A.
Mocznik
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)
B.
Kwas moczowy
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)
C.
Histydyna
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)
D.
Leucyna
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)
E.
Siarczan amonu
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)
F.
Allantoina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

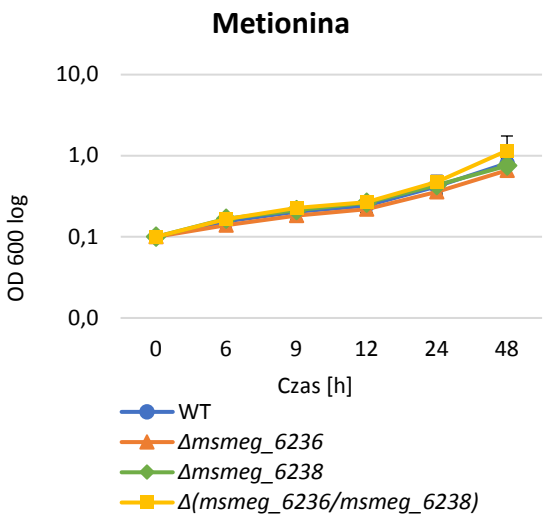
G.


Hydantoina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

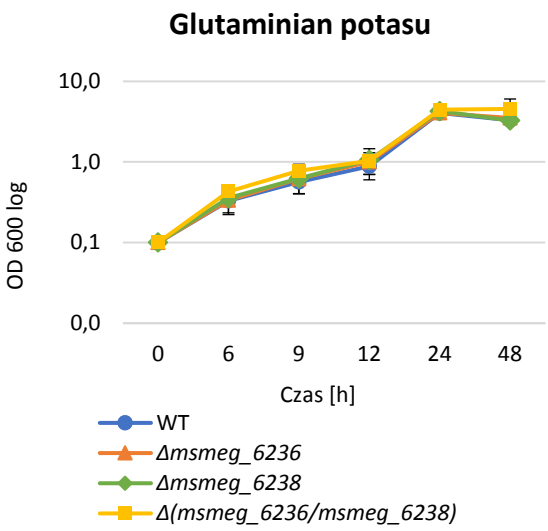
H.


Prolina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

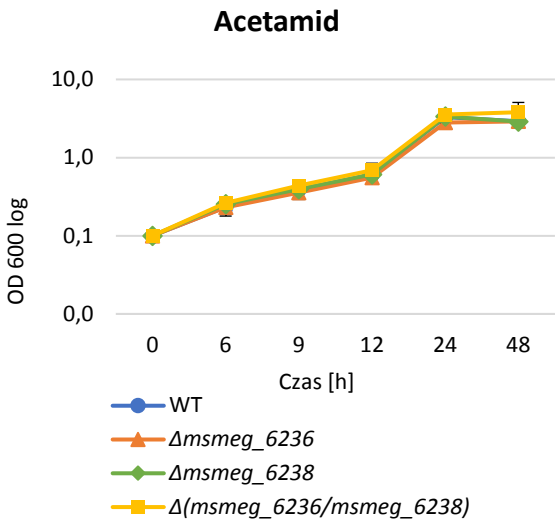
I.


Metionina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

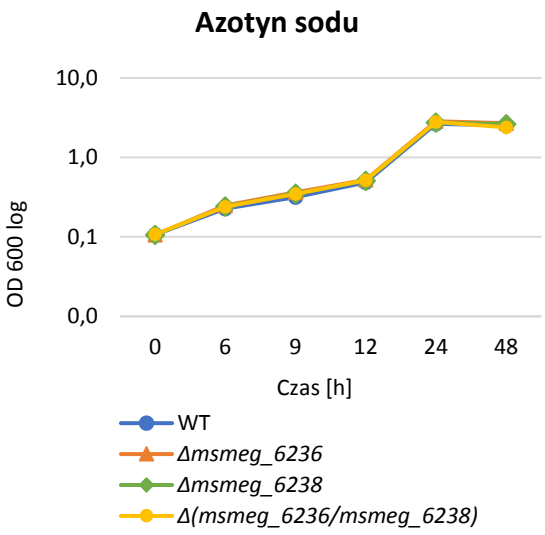
J.

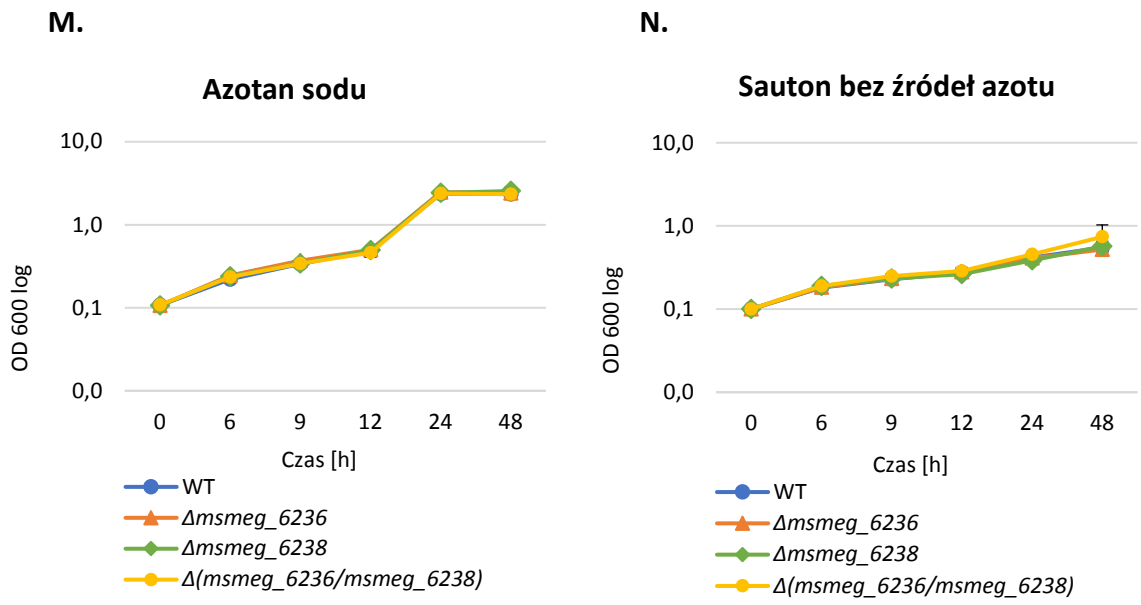

Glutaminian potasu
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

K.


Acetamid
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)

L.


Azotyn sodu
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
6
9
12
24
48
Czas [h]
WT
Δmsmeg_6236
Δmsmeg_6238
Δ(msmeg_6236/msmeg_6238)



Rycina 33. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton pozbawionym źródeł azotu **(N)** oraz z dodatkiem związków azotowych. **(A)** Mocznika. **(B)** Kwasu moczowego. **(C)** Histydyny. **(D)** Leucyny. **(E)** Siarczanu amonu. **(F)** Allantoiny. **(G)** Hydantoiny. **(H)** Proliny. **(I)** Metioniny. **(J)** Glutaminianu potasu. **(K)** Acetamidu. **(L)** Azotynu sodu. **(M)** Azotanu sodu. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*msmeg_6236* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_6238*, Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_6236* oraz *msmeg_6238*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach.

Przeprowadzone analizy wykazały, że inaktywacja genów systemu MnoSR w genomie *M. smegmatis* nie wpływa na zdolność tych bakterii do rozkładu badanych związków azotowych (**Rycina 33A-M.**). Analiza kinetyki wzrostu analizowanych szczepów wykazała obniżenie tempa wzrostu wszystkich analizowanych szczepów hodowanych w obecności leucyny, hydantoiny i metioniny stanowiących jedyne źródło azotu (**Rycina 33D,G,I.**).

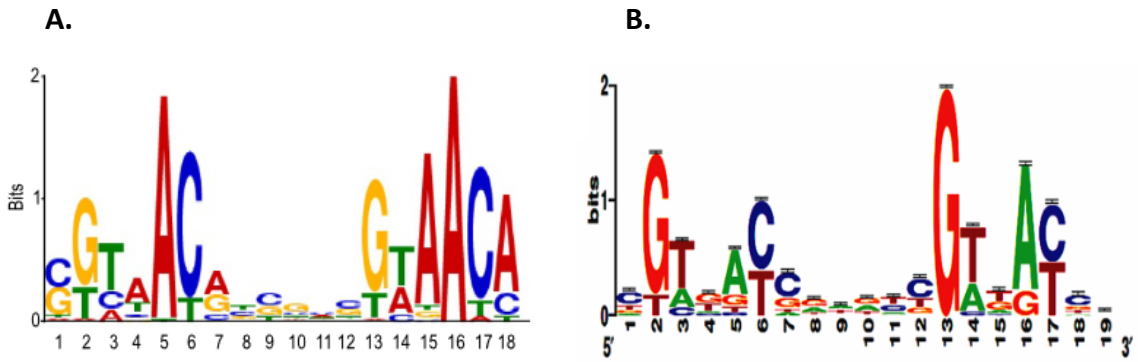
Analiza kinetyki wzrostu badanych szczepów wykazała, iż zarówno szczep kontrolny jak i mutanty Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* i Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238*) posiadają zdolność do metabolizowania mocznika, kwasu moczowego, histydyny, siarczanu amonu, allantoiny, proliny, glutaminianu potasu, acetamidu, azotynu sodu i azotanu sodu, jako jedynych źródeł azotu, uzyskując w 48 godzinie eksperymentu wartość współczynnika

gęstości optycznej (w zależności od źródła azotu) w zakresie około 2,4 do 4,7 (**Rycina 33A-C,E-F,H,J-M.**).

Żaden z badanych szczepów nie wykazywał zdolności do wzrostu na podłożu Sauton bez dodanego źródła azotu (**Rycina 33N.**).

5.8. Ocena potencjalnej roli regulatora MtrA w metabolizmie azotu u *M. smegmatis*

Jednym z kluczowych białek regulujących proces asymilacji azotu u mykobakterii jest białko GlnR (MSMEG_5784). Mutanty pozbawione funkcjonalnego genu kodującego to białko regulatorowe są niezdolne do asymilacji wielu źródeł azotu takich jak kwas moczowy, histydyna, leucyna, glutaminian potasu czy siarczan amonu (Antczak i wsp., 2018). Miejsce wiązania dla białka regulatorowego GlnR (Jenkins i wsp., 2013; Gorla i wsp., 2018) w obszarach promotorowych szeregu genów wykazuje wysoki stopień homologii do miejsca rozpoznawanego przez inne białko regulatorowe mykobakterii, MtrA (MSMEG_1874) (**Rycina 34.**). Dlatego też postanowiono zbadać potencjalną rolę regulatora odpowiedzi MtrA w metabolizmie azotu u *M. smegmatis.* Mutanty *M. smegmatis* pozbawione zdolności syntezy funkcjonalnych białek MtrA oraz GlnR są dostępne w kolekcji PGiFM IBM PAN. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej postanowiono skonstruować podwójnego mutanta *M. smegmatis* pozbawionego równocześnie obu funkcjonalnych genów kodujących białka regulatorowe GlnR oraz MtrA. W tym celu w mutancie Δ*mtrA* z wykorzystaniem procesu homologicznej rekombinacji zinaktywowano gen *glnR*.



Rycina 34. Konsensus motywu wiążącego DNA białek. **(A)** MtrA. **(B)** GlnR w komórkach mykobakterii (schemat wygenerowany z wykorzystaniem analizy MEME, wg odpowiednio Gorla i wsp., 2018 oraz Jenkins i wsp., 2013).

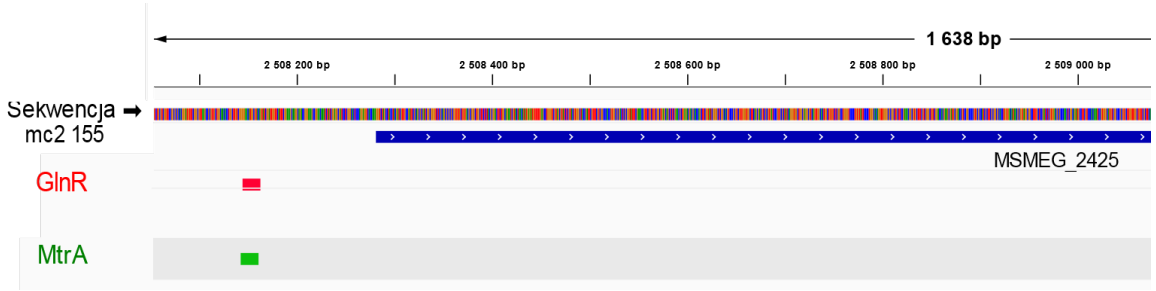
Zarówno na etapie selekcji pojedynczych, jak i podwójnych rekombinantów genotypy wybranych mutantów weryfikowano poprzez reakcję amplifikacji i hybrydyzacji typu Southern blot.

Analiza motywów wiązania białek MtrA i GlnR

Ze względu na wysoki stopień podobieństwa sekwencji konsensusowych białek MtrA (Gorla i wsp., 2018) i i GlnR (Jenkins i wsp., 2013) (**Tabela 36.**), uzyskane wyniki globalnej analizy transkryptomów oraz opublikowane dane potwierdzające, iż białko GlnR wiąże się do promotora genu *amtB* (*msmeg_2425*), postanowiono przeprowadzić analizę oddziaływania białka MtrA w układzie regulator – promotor, wykorzystując jako sekwencję region promotorowy genu *msmeg_2425*.

Tabela 36. Motywy wiązania białek MtrA i GlnR.

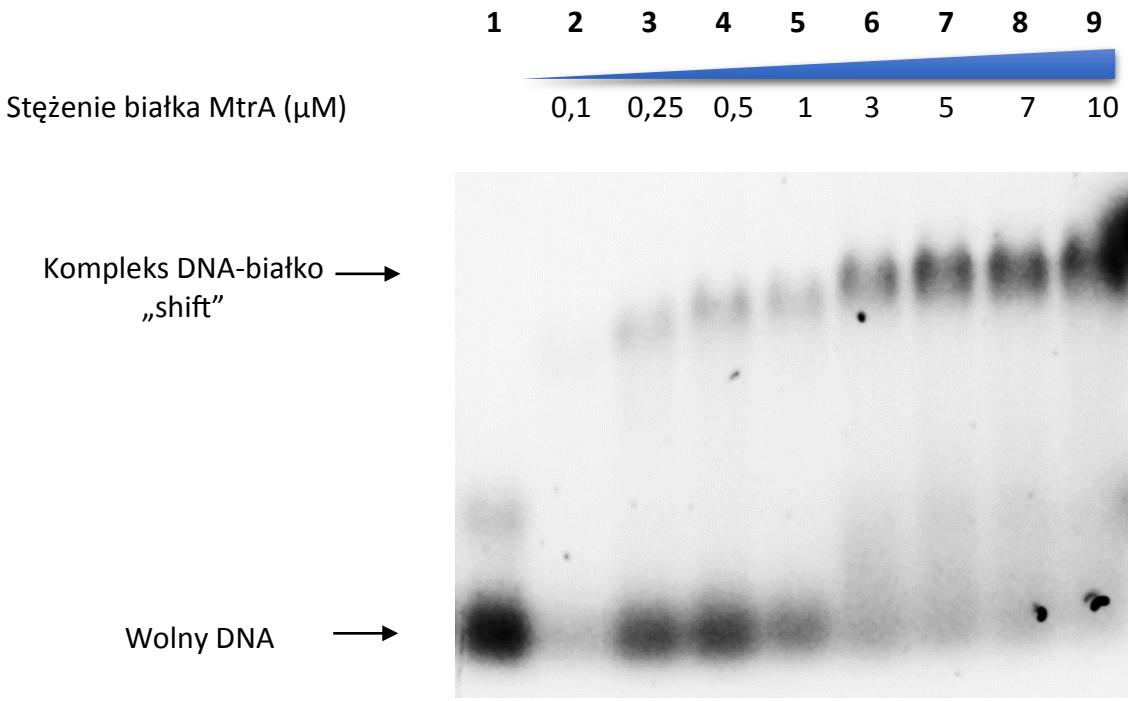
Motyw wiązania białka MtrA (wg Gorl`a i wsp., 2018)	Motyw wiązania białka GlnR (wg Jenkins`a i wsp., 2013)
NGWNAYNNNNNNGWNRYN	SKHNAYNNNNNNKHNAYM



Rycina 35. Sekwencje konsensusowe białek MtrA i GlnR w regionie promotorowym genu *amtB M. smegamtis* (schemat wygenerowany w programie IGV (Integrative Genomics Viewer, Robinson i wsp., 2012) oraz Inkscape.

W celu otrzymania białka MtrA *M. smegmatis* przygotowano rekombinowany plazmid pKS22 posiadający mykobakteryjny gen *mtrA* w fuzji z etykietą His. Ekspresję białka przeprowadzono w szczepie *E. coli* BL21 według procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.23**. Rekombinowane białko MtrA oczyszczono poprzez chromatografię powinowactwa na złożu niklowym (**Metody 4.24**). W celu określenia odziaływania białka MtrA z sekwencją promotorową genu *amtB* przeprowadzono analizę z wykorzystaniem metody EMSA wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.26**.

Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rycinie 36**.

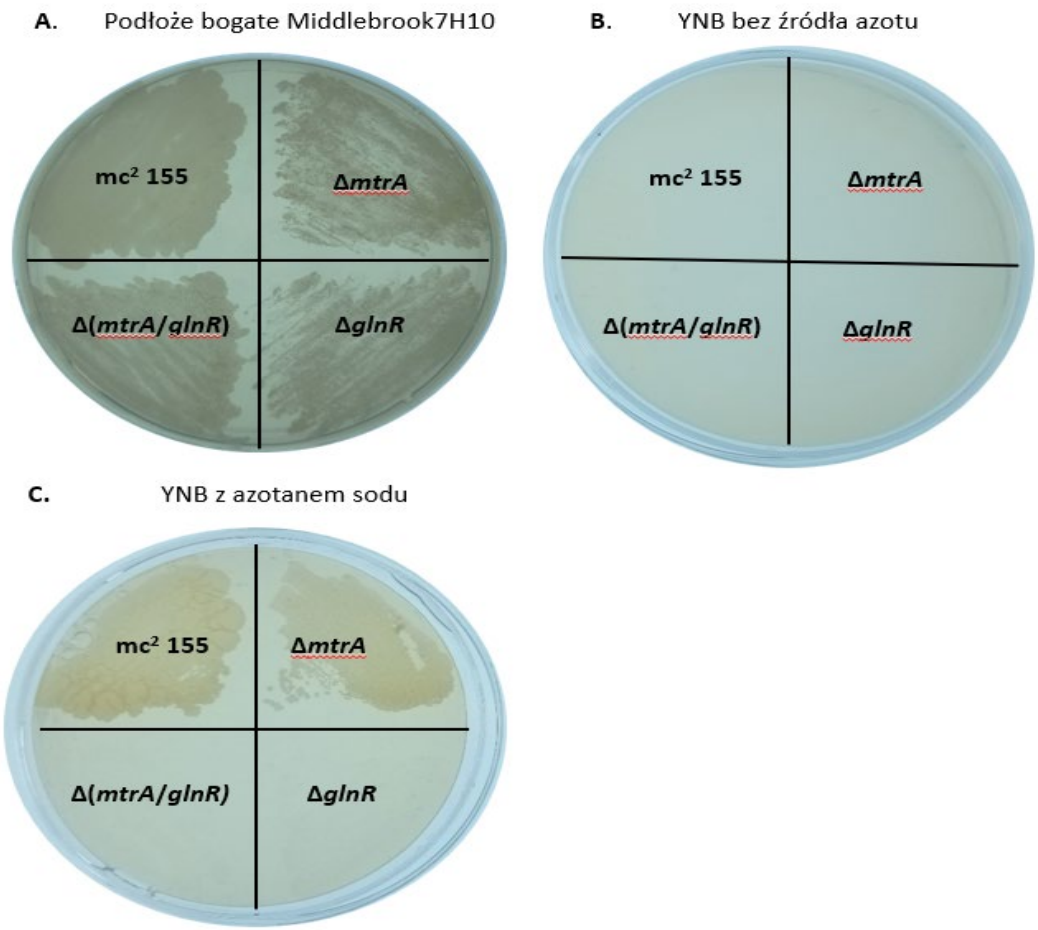


Rycina 36. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji białka MtrA *M. smegmatis* z sekwencją promotorową genu *msmeg_2445*.

Przeprowadzona analiza wykazała, iż białko MtrA wydajnie wiąże się z regionem promotorowym genu *amtB*.

5.9. Analiza kinetyki wzrostu szczepów *M. smegmatis* na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem związków azotowych

W celu określenia zdolności analizowanych szczepów mutantów Δ*mtrA*, Δ*glnR* oraz Δ(*mtrA*/*glnR*) do wykorzystania różnych źródeł azotu postanowiono zweryfikować, czy brak funkcjonalnych genów *mtrA, glnR oraz mtrA/glnR* wpływa na przeżywalność komórek *M. smegmatis* na podłożu YNB z dodatkiem azotanu sodu (10 mM) jako jedynym źródłem azotu. Eksperyment przeprowadzono wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.21**. Uzyskane dane przedstawiono na **Rycinie 37**.

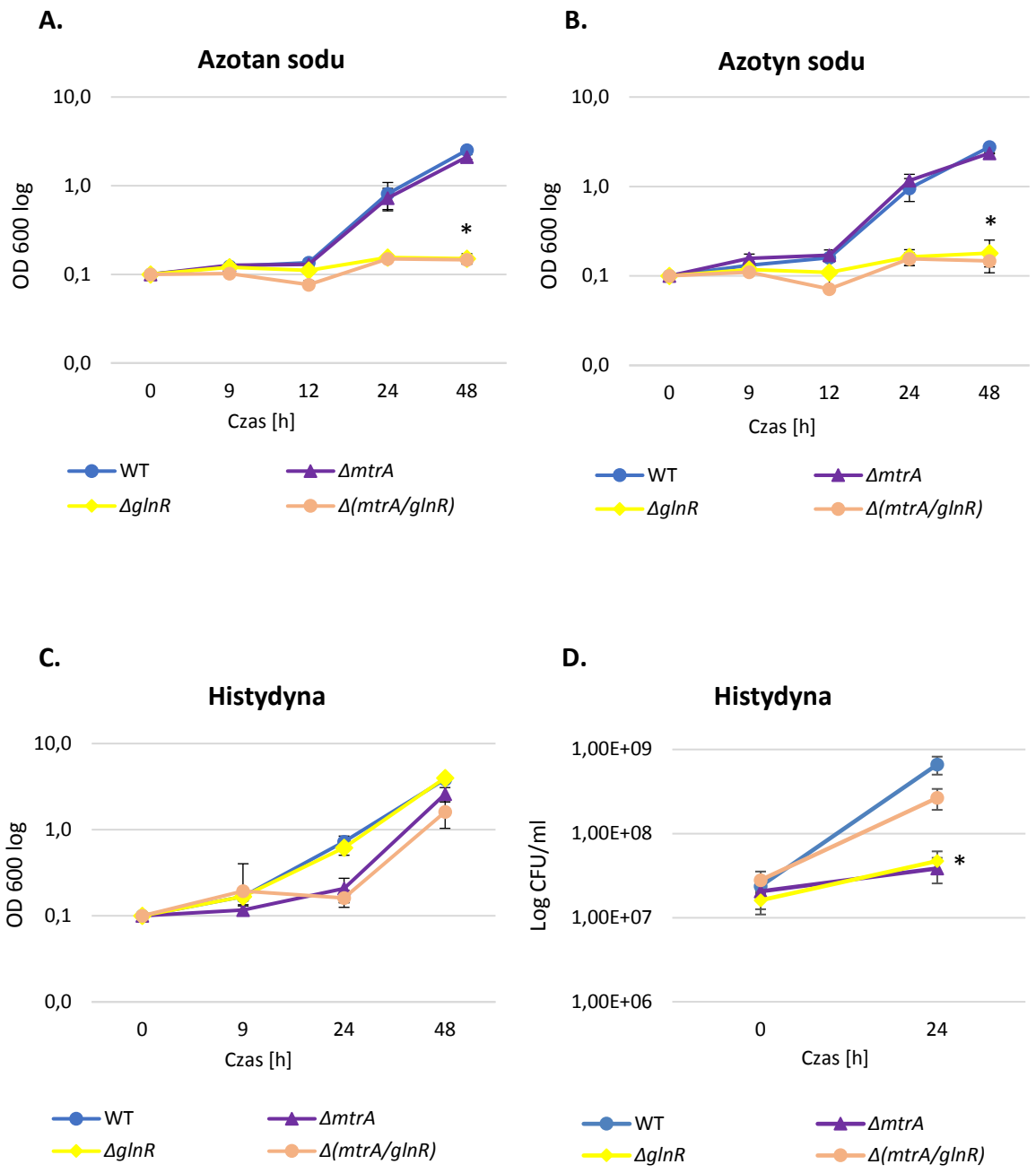


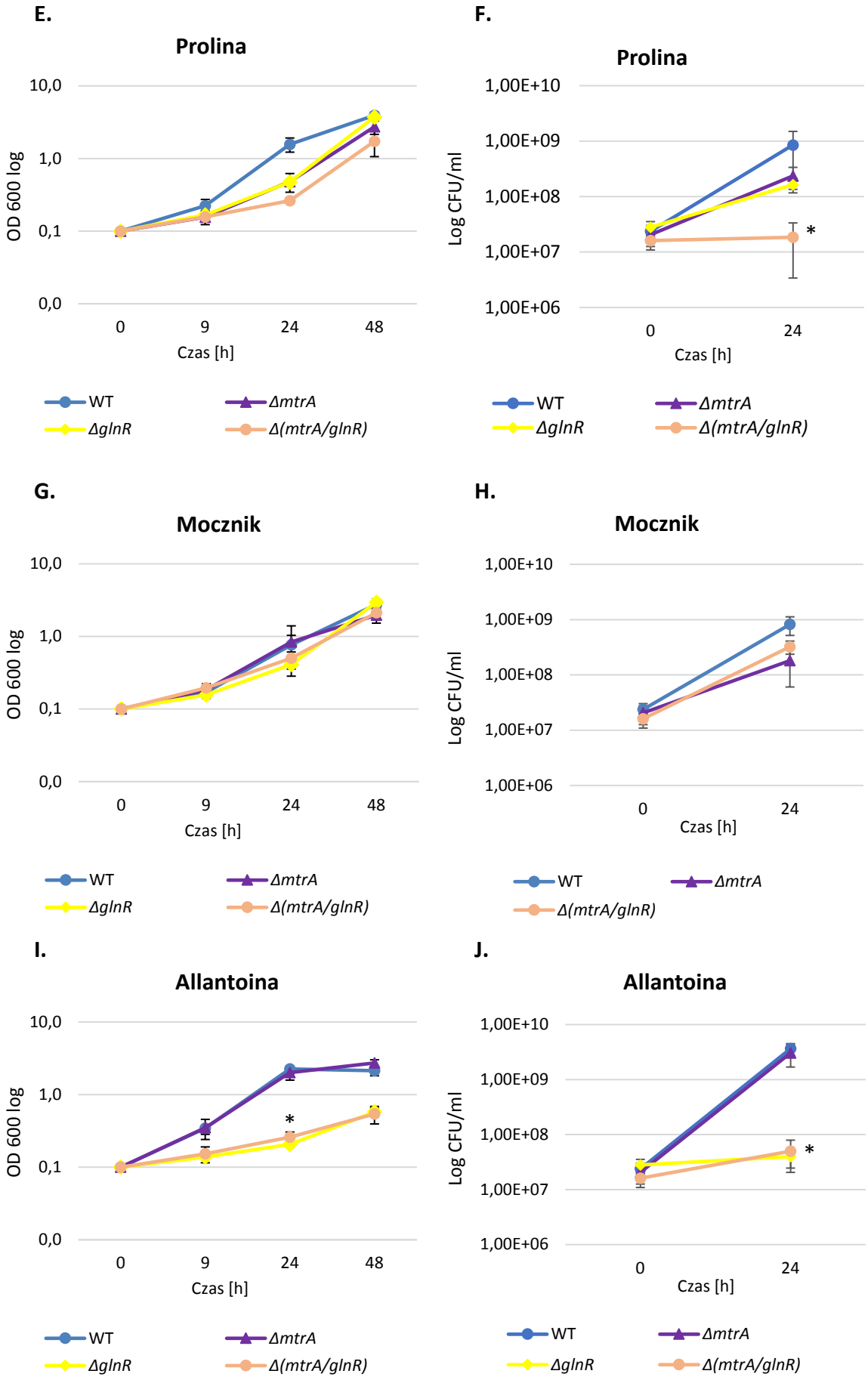
Rycina 37. Analiza zdolności do wzrost szczepu *M. smegmatis* mc^2 155, szczepów mutantów Δ*mtrA*, Δ*glnR* oraz Δ(*mtrA*/*glnR*) na podłożu z limitowanym dostępem azotu. **(A)** Podłożu bogatym Middlebrook 7H10. **(B)** YNB pozbawionym źródła azotu. **(C)** YNB z dodatkiem azotanu sodu (10 mM).

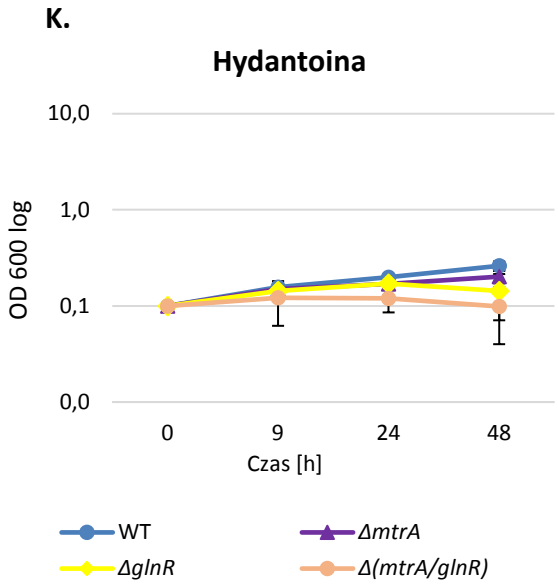
Przeprowadzona analiza wykazała, iż badane szczepy nie wykazują zdolności do wzrostu na podłożu YNB pozbawionym źródła azotu (**Rycina 37.**). Na podłożu YNB z dodatkiem azotanu sodu zdolności do wzrostu nie wykazywały jedynie szczepy mutanty pozbawione funkcjonalnego genu *glnR* [Δ*glnR;* Δ(*mtrA*/*glnR*)], natomiast inaktywacja genu *mtrA* nie wpłynęła na zdolność do wykorzystania azotanu sodu jako jedynego źródła azotu (**Rycina 37.**). Jako kontrolę zastosowano podłoże bogate 7H10 z dodatkiem OADC, na którym obserwowano wzrost wszystkich analizowanych szczepów.

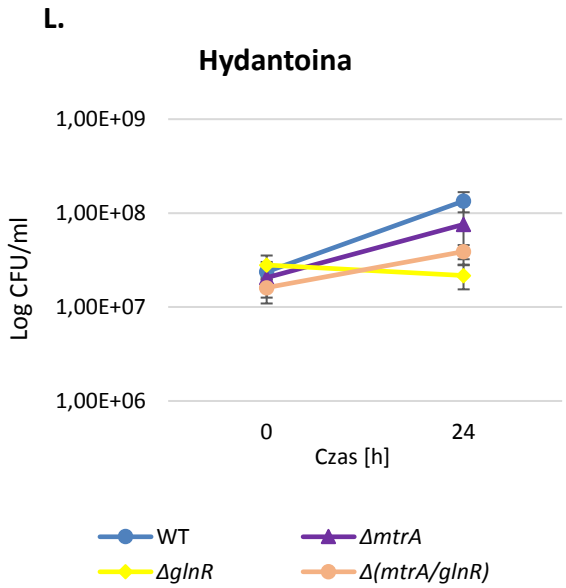
Następnie przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu oraz przeżywalności szczepów mutantów Δ*mtrA,* Δ*glnR* oraz Δ(*mtrA/glnR*) w obecności wybranych związków azotowych w stężeniu końcowym 2,5 mM (azotan sodu), 5 mM (acetamid) lub 10 mM (allantoina, azotyn sodu, glutaminian potasu, histydyna, hydantoina, kwas moczowy, leucyna,

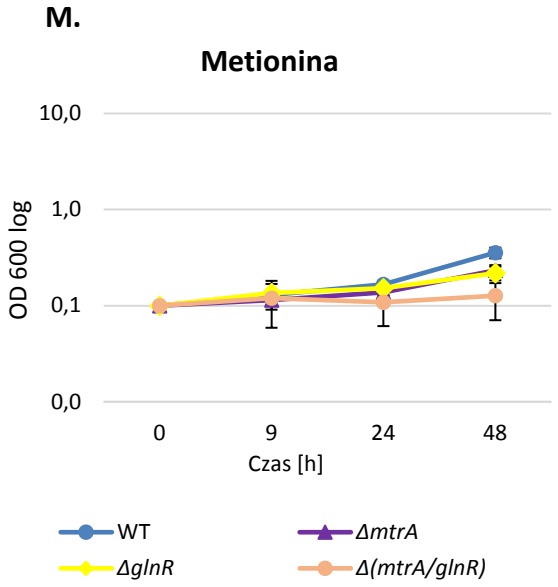
metionina, mocznik, prolina, siarczan amonu). Hodowle szczepu kontrolnego oraz badanych mutantów prowadzono w podłożu minimalnym Sauton'a z dodatkiem ww. źródeł azotu wg procedury opisanej w rozdziale **Metody 4.21**.

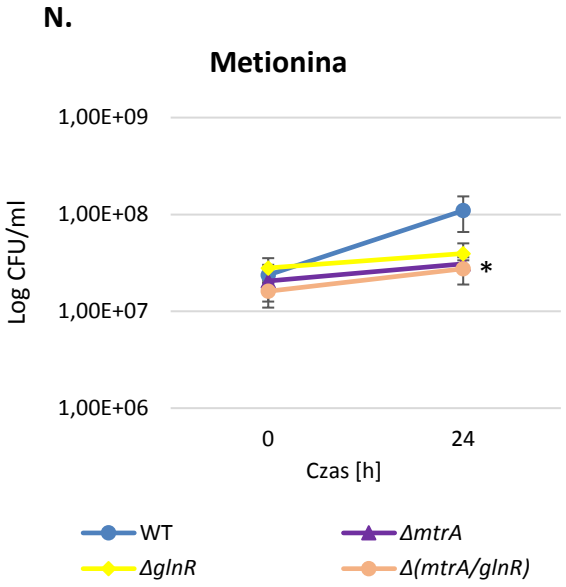


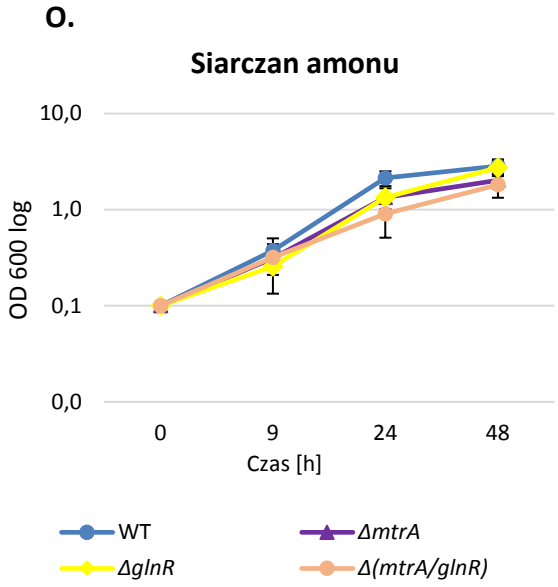

E.
Prolina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)
F.
Prolina
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
*
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)
G.
Mocznik
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)
H.
Mocznik
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
Δ(mtrA/glnR)
I.
Allantoina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
*
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)
J.
Allantoina
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
*
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

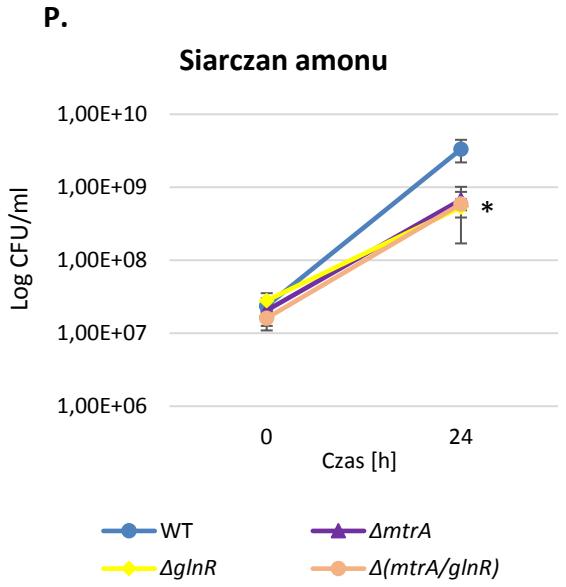

K.
Hydantoina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

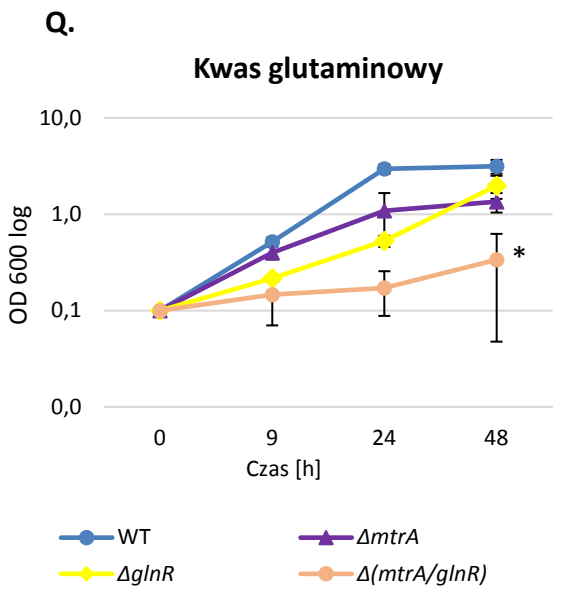

L.
Hydantoina
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

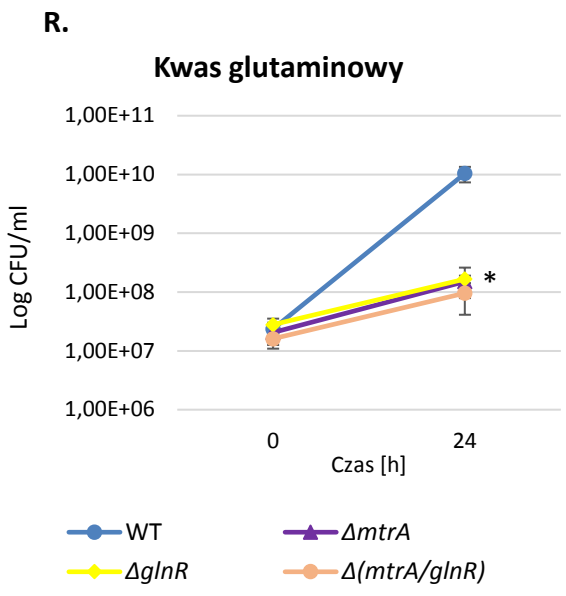

M.
Metionina
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

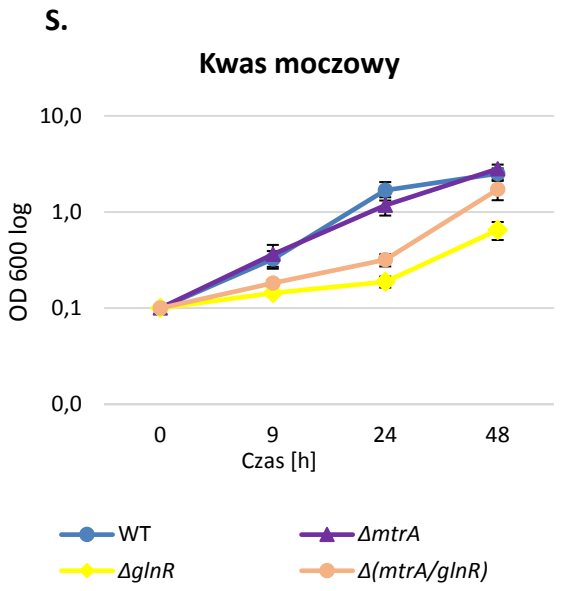

N.
Metionina
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
*
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

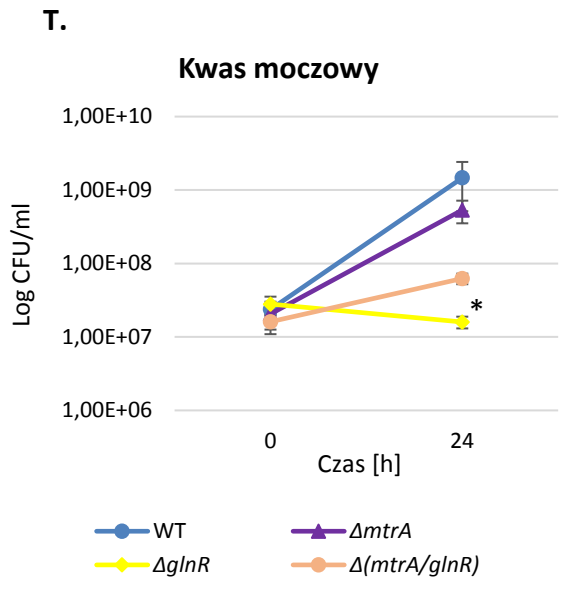

O.
Siarczan amonu
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

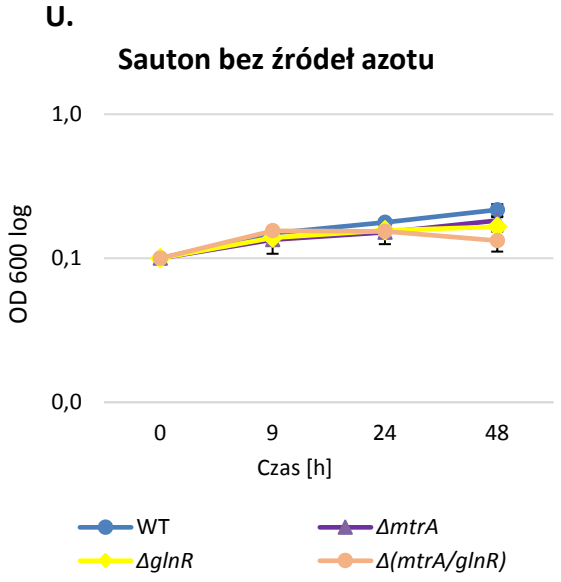

P.
Siarczan amonu
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
*
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

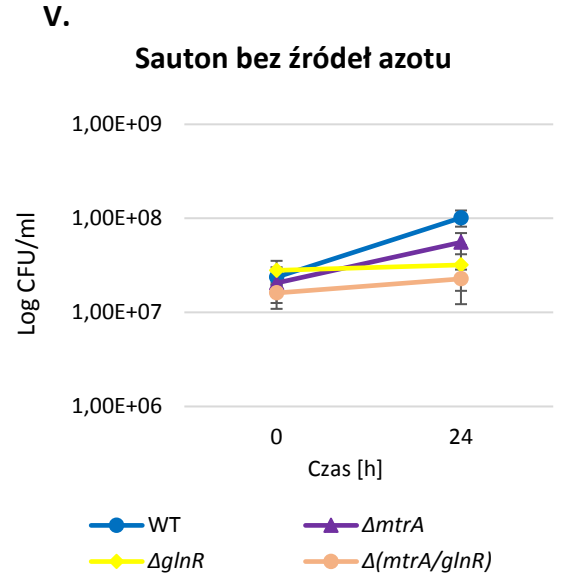

Q.
Kwas glutaminowy
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
*
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)


R.
Kwas glutaminowy
1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
*
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)


S.
Kwas moczowy
10,0
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)


T.
Kwas moczowy
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
*
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)


U.
Sauton bez źródeł azotu
1,0
0,1
0,0
OD 600 log
0
9
24
48
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)


V.
Sauton bez źródeł azotu
1,00E+09
1,00E+08
1,00E+07
1,00E+06
Log CFU/ml
0
24
Czas [h]
WT
ΔmtrA
ΔglnR
Δ(mtrA/glnR)

Rycina 38. Analiza kinetyki wzrostu oraz przeżywalności szczepów *M. smegmatis.* Analiza kinetyki wzrostu szczepów na podłożu minimalnym Sauton pozbawionym źródeł azotu **(U)** oraz z dodatkiem związków azotowych. **(A)** Azotanu sodu. **(B)** Azotynu sodu. **(C)** Histydyny. **(E)** Proliny. **(G)** Mocznika. **(I)** Allantoiny. **(K)** Hydantoiny. **(M)** Metioniny. **(O)** Siarczanu amonu. **(Q)** Kwasu glutaminowego. **(S)** Kwasu moczowego. Analiza przeżywalności (CFU/ml) szczepów bez dodatkowych źródeł azotu **(V)** i w obecności źródła azotu. **(D)** Histydyny. **(F)** Proliny. **(H)** Mocznika. **(J)** Allantoiny. **(L)** Hydantoiny. **(N)** Metioniny. **(P)** Siarczanu amonu. **(R)** Kwasu glutaminowego. **(T)** Kwasu moczowego. WT – szczep wyjściowy „dziki", Δ*mtrA* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_1874*, Δ*GlnR* – mutant pozbawiony funkcjonalnego genu *msmeg_5784*, Δ(*mtrA/glnR*) – mutant pozbawiony funkcjonalnych genów *msmeg_1874* oraz *msmeg_5784*. Przedstawiono wyniki uzyskane w trzech biologicznych powtórzeniach. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem testu *t*-Studenta (*$p \leq 0{,}05$).

Na podstawie danych literaturowych oraz badań naszego zespołu (Antczak i wsp., 2018) zakładaliśmy, że mutant Δ*glnR* nie będzie posiadał zdolności do wzrostu na podłożu minimalnym z dodatkiem kwasu moczowego, histydyny, leucyny, siarczanu amonu, allantoiny, hydantoiny, proliny, glutaminianu potasu i acetamidu, jako jedynym źródłem azotu. Zgodnie z oczekiwaniem nasze analizy wykazały, że badany szczep pozbawiony funkcjonalnego białka GlnR nie jest zdolny do wykorzystania azotanu i azotynu sodu, allantoiny czy kwasu moczowego. Aby zbadać potencjalną rolę MtrA w regulacji metabolizmu azotu analizowaliśmy także zdolność do wzrostu w obecności różnych źródeł azotu szczepu mutanta pozbawionego funkcjonalnego genu *mtrA* oraz podwójnego mutanta pozbawionego obu badanych białek regulatorowych MtrA i GlnR. Mutant pozbawiony zdolności do syntezy MtrA charakteryzował się osłabionym wzrostem i/lub przeżywalnością na podłożu minimalnym z dodatkiem histydyny, proliny, metioniny, siarczanu amonu oraz kwasu glutaminowego. Ponadto podwójny mutant pozbawiony obu białek charakteryzował się niższą przeżywalnością niż mutant Δ*glnR* na podłożu z dodatkiem proliny oraz lepszą przeżywalnością na podłożu z histydyną. Na podłożu z kwasem glutaminowym jako jedynym źródłem azotu podwójny mutant charakteryzował się osłabionym wzrostem, lecz podobną przeżywalnością jak mutant Δ*glnR.*

Analiza kinetyki wzrostu analizowanych szczepów wykazała znaczące obniżenie tempa wzrostu szczepu Δ(*mtrA/glnR)* w porównaniu do szczepu kontrolnego w obecności azotynu sodu, azotanu sodu, histydyny, proliny, allantoiny, hydantoiny, metioniny, siarczanu amonu, kwasu glutaminowego oraz kwasu moczowego (**Rycina 38A-B,G,I,K,Q,S.**) stanowiących jedyne źródło azotu. Nieznaczne obniżenie kinetyki wzrostu mutanta Δ(*mtrA/glnR)* zaobserwowano na podłożu minimalnym z dodatkiem histydyny, proliny i siarczanu amonu (**Rycina 38C-D,O.**). Niewielki stopień zahamowania wzrostu obserwowano również w przypadku szczepu mutanta Δ*mtrA* w porównaniu do szczepu dzikiego na podłożu Sauton z dodatkiem histydyny, proliny, mocznika, hydantoiny, metioniny, siarczanu amonu oraz kwasu glutaminowego (**Rycina 38C,E,G,K,M,O,Q.**). Przeprowadzone analizy wskazują na obniżenie tempa wzrostu szczepu Δ*glnR* w podłożu minimalnym z dodatkiem azotanu sodu, azotynu sodu, proliny, allantoiny, hydantoiny, metioniny, kwasu glutaminowego i kwasu moczowego stanowiących jedyne źródło azotu (**Rycina 38A-B,E,I,K,M,Q,S.**). Najmniejsze różnice w kinetyce wzrostu oraz w stopniu wykorzystania związków azotowych, pomiędzy wszystkimi analizowanymi szczepami zaobserwowano w obecności mocznika, hydantoiny, metioniny oraz siarczanu amonu (**Rycina 39E,K,M,O.**). Uzyskane dane wskazują, iż żaden z badanych szczepów nie posiada zdolności do wykorzystania hydantoiny oraz metioniny (**Rycina 38K,M.**), jako jedynych źródło azotu.

Analiza przeżywalności (CFU/ml) analizowanych szczepów wykazała znaczące obniżenie tempa wzrostu w przypadku szczepu Δ(*mtrA/glnR)* hodowanego w obecności proliny, allantoiny, hydantoiny, metioniny, kwasu glutaminowego oraz kwasu moczowego stanowiących jedyne źródło azotu (**Rycina 38F,J,L,N,R,T.**). Nieznaczne obniżenie przeżywalności szczepu mutanta Δ(*mtrA/glnR)* zaobserwowano w przypadku hodowli prowadzonej w obecności histydyny, mocznika oraz siarczanu amonu (**Rycina 38D,H,P.**). Szczep mutant Δ*mtrA* charakteryzował się niską przeżywalnością w obecności histydyny, proliny, mocznika, metioniny oraz kwasu glutaminowego (**Rycina 38D,F,H,N,R.**). Zaobserwowano również niższą przeżywalność szczepu Δ*glnR* w obecności histydyny, proliny, allantoiny, hydantoiny, metioniny, siarczanu amonu, kwasu glutaminowego oraz kwasu moczowego (**Rycina 38D,F,J,L,N,P,R,T.**).

5.10. Globalna analiza transkryptomiczna mutanta Δ*mtrA*

Uzyskane wyniki jasno wskazują na udział regulatora MtrA w pozyskiwaniu przez prątki azotu w postaci niektórych aminokwasów. W celu uzyskania pełniejszego obrazu zaangażowania MtrA w metabolizm azotu przeprowadzono globalną analizę odpowiedzi transkrypcyjnej *M. smegmatis* Δ*mtrA* oraz *M. smegmatis* Δ(*mtrA*/*glnR*) w podłożu minimalnym w warunkach głodzenia azotowego i porównano uzyskane wyniki do danych z tych samych warunków dla mutanta *M. smegmatis* Δ*glnR* oraz szczepu „dzikiego".

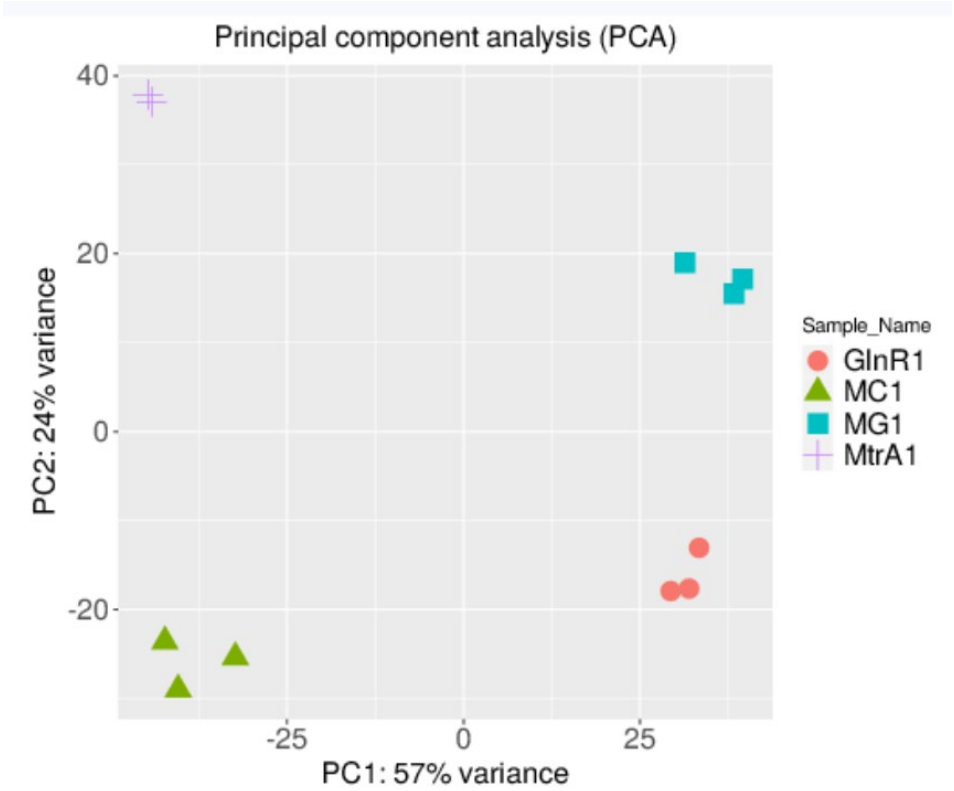
Do przeprowadzenia analiz wykorzystano całkowity RNA izolowany z komórek szczepu kontrolnego oraz mutantów Δ*mtrA*, Δ*glnR,* Δ(*mtrA*/*glnR*) rosnących na podłożu minimalnym Sauton pozbawionym źródeł azotu z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu (**Tabela 37.**).

Tabela 37. Oznaczenia układów doświadczalnych poddanych analizie RNA-seq, wykorzystanych podczas obróbki danych.

Oznaczenie układu doświadczalnego	Układ doświadczalny
1 mM mc2 155	Hodowla szczepu dzikiego prowadzona w podłożu Sauton bez źródła azotu z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu
1 mM MtrA	Hodowla szczepu Δ*mtrA* prowadzona w podłożu Sauton bez źródła azotu z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu
1 mM GlnR	Hodowla szczepu Δ*glnR* prowadzona w podłożu Sauton bez źródła azotu z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu
1 mM MtrA/GlnR	Hodowla szczepu Δ(*mtrA*/*glnR*) prowadzona w podłożu Sauton bez źródła azotu z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu

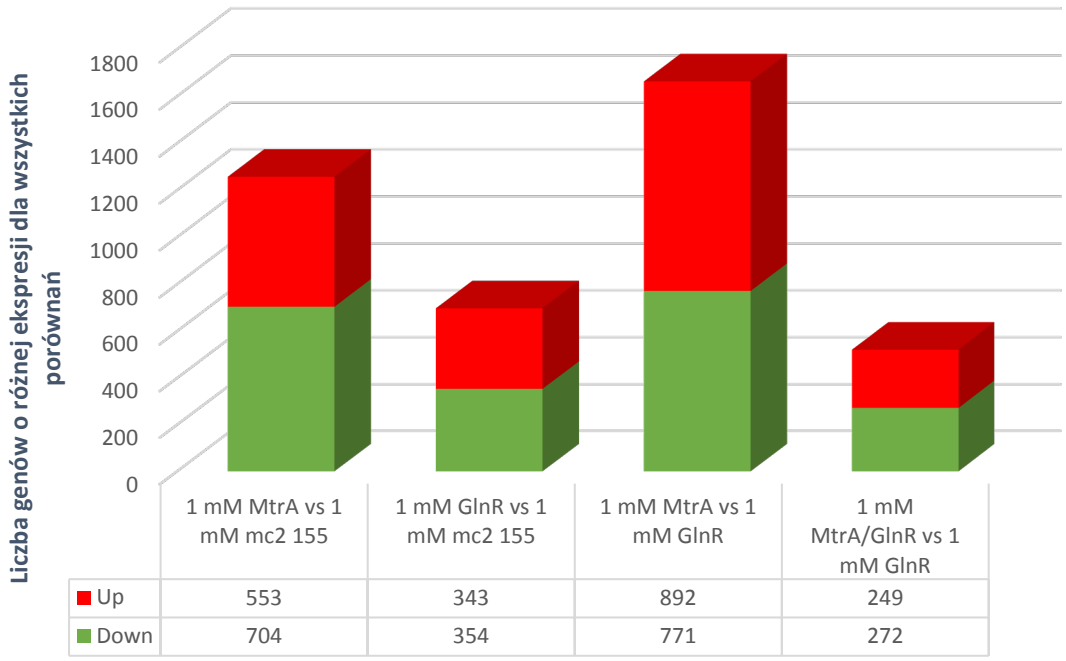
Uzyskane dane transkryptomiczne dla wszystkich szczepów hodowanych w ww. warunkach zostały poddane analizie w programach DeGust oraz iDEP.96. Dane nieprzetworzone uzyskane w ramach analizy RNA-seq, zostały dołączone do pracy w postaci suplementu (**Suplement 3.**).

Przeprowadzona analiza PCA (ang. *Principal component analysis*) pokazała, że powtórzenia wykonane dla każdego szczepu oraz dla poszczególnych warunków grupują się niezależnie (**Rycina 39.**).



Rycina 39. Analiza głównych składowych (PCA). MC1 – szczep kontrolny, MtrA1 – Δ*mtrA*, GlnR1– Δ*glnR*, MG1 – Δ(*mtrA/glnR*) – hodowle prowadzone w podłożu Sauton bez źródła azotu z dodatkiem siarczanu amonu w stężeniu końcowym 1 mM.

Analiza porównawcza danych transkryptomicznych dla RNA izolowanego z komórek szczepu kontrolnego oraz mutantów Δ*mtrA,* Δ*glnR,* Δ(*mtrA/glnR*) przeprowadzona z wykorzystaniem platformy analitycznej iDEP.96, pozwoliła na określenie liczby genów, które charakteryzowały się istotnie zmienionym poziomem ekspresji (differential expressed genes-DEGs) przy poziomie odcięcia (Log2FC =|1.583|; fold change = |3|; $p > 0.05$ – zmiana 3-krotna lub większa) (**Rycina 40.**).



Rycina 40. Liczba genów wykazujących zmieniony poziom ekspresji w analizowanych układach. Ang. *down* – liczba genów ulegających represji; *up* – liczba genów ulegających indukcji

Największe zmiany poziomu ekspresji genów zaobserwowano porównując dane uzyskane dla szczepów Δ*mtrA* i Δ*glnR* rosnących w podłożu Sauton pozbawionym źródeł azotu z dodatkiem siarczanu amonu w stężeniu 1 mM (**Rycina 40.**). Ponadto zaobserwowano znaczne różnice w ekspresji genów szczepu Δ*mtrA* w odniesieniu do szczepu kontrolnego mc^2 155 (**Rycina 40.**). Najmniejsza zmienność w poziomie ekspresji genów dotyczyła szczepu mutanta Δ*glnR* oraz szczepu Δ(*mtrA/glnR*) w odniesieniu do mutanta Δ*glnR* (**Rycina 40.**).

Przeprowadzona analiza transkryptomiczna z wykorzystaniem platform KEGG i Degust RNA-seq, pozwoliła na wskazanie procesów metabolicznych regulowanych przez geny charakteryzujące się największym zróżnicowaniem poziomu ekspresji wśród analizowanych układów eksperymentalnych. Uzyskane dane przedstawiono w **Tabeli 38**.

Tabela 38. Poziom zróżnicowania ekspresji genów badanych szczepów *M. smegmatis* w warunkach głodu azotowego, z uwzględnieniem wybranych procesów metabolicznych.

Proces metaboliczny	Układy eksperymentalne poddane analizie RNA-seq			
	A	B	C	D
	MtrA vs mc2 155	GlnR vs mc2 155	MtrA vs GlnR	MtrA/GlnR vs GlnR
Biosynteza argininy	4,86 - 4,94	4,14 - 15,22	12,34	4,46
Biosynteza kwasów tłuszczowych	- 7,04	- 6,32	9,94 - 9,08	
Biosynteza kwasu foliowego	4,6	- 6,04		
Biosynteza lizyny		- 7,34	8,04	
Biosynteza pantotenianu i CoA	- 12,26	7,28 - 15,44	11,2	
Biosynteza waliny, leucyny i izoleucyny	4,94		9,62	4,24
Cykl cytrynowy (TCA)	4,3			
Degradacja benzoesanów	- 5,74	8,46	- 7,82	
Degradacja fluorobenzoesanu	- 4,4	8,64	- 7,82	
Degradacja kwasów tłuszczowych	- 5,64	4,22 - 8,08	9,44	
Degradacja lizyny	- 5,64	4,22	8,04	
Degradacja waliny, leucyny i izoleucyny	- 5,92	4,22 - 8,08	9,44	
Glikoliza / Glukoneogeneza	7,6 - 7,92	4,12	- 8,82	
Interkonwersja pentozy i glukuronianu	7,16 5,64	6,98		
Metabolizm alaniny, aspartanu i glutaminianu	4,86 - 7,96	4,41 10,64	- 7,82 12,34	
Metabolizm argininy i proliny	6,18	5,54	7,12	
Metabolizm askorbinianu i aldaranu	6,88	5,34		
Metabolizm azotu	4,86	4,14 10,64	12,34	
Metabolizm beta-alaniny	- 12,26	4,5	11,2	
Metabolizm biotyny	- 4,26	- 6,32	9,94	
Metabolizm butanianu	4,94 - 7,96	4,22 - 8,08	9,62	
Metabolizm cysteiny i metioniny	- 4,9			
Metabolizm fosforanu inozytolu	6,42 - 4,12			
Metabolizm fruktozy i mannozy	- 4,96		- 7,89	
Metabolizm galaktozy	- 6,18	- 8,1	- 7,98	
Metabolizm glicerolipidów	4,06 - 15,44			- 12,0
Metabolizm glicyny, seryny i treoniny	- 6,18		7,72	

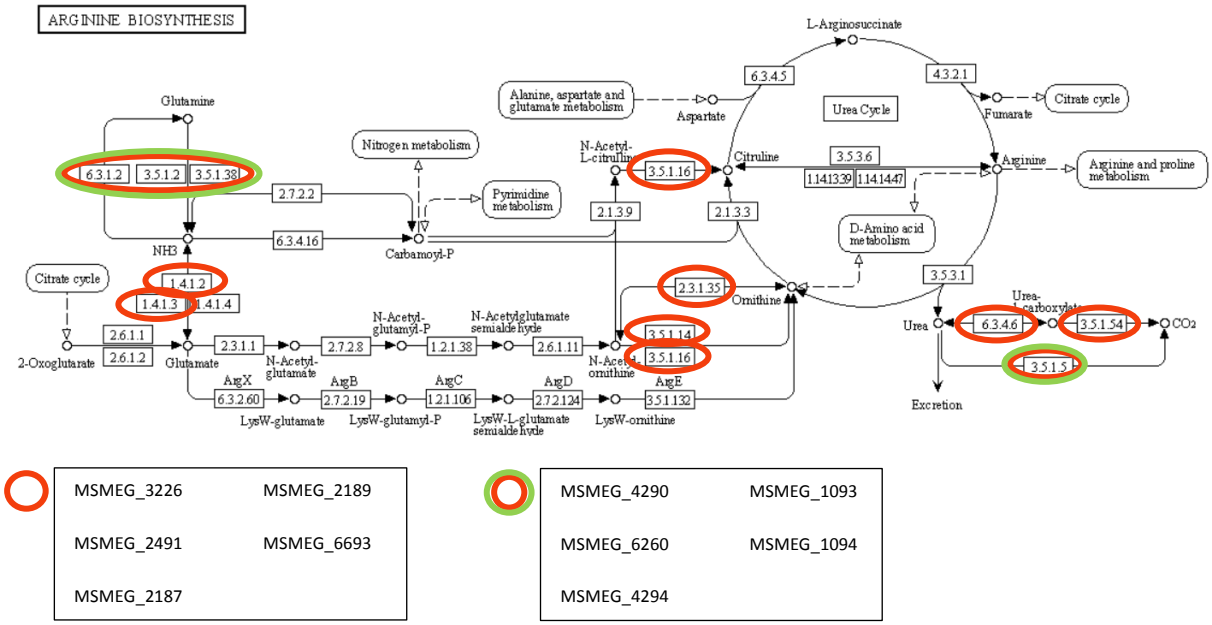
Metabolizm glioksylanów i dikarboksylanów	4,86	8,64	12,34	
		10,64	- 8,34	
Metabolizm histydyny		4,7		
Metabolizm metanu	7,6	4,12	- 8,82	
	- 5,92			
Metabolizm pirogronianu	7,6	4,22	- 8,82	
	- 5,92			
Metabolizm pirymidyn	4,18	4,5	10,12	
	- 12,26	- 17,24		
Metabolizm propionianu	7,6	4,12	9,44	
	- 5,64	- 8,08		
Metabolizm puryn	- 4,94	- 10,08	12,56	4,46
Metabolizm skrobi i sacharozy	- 4,02			
Metabolizm tiaminy	4,6			
Metabolizm tryptofanu	- 5,64	4,22		
Metabolizm tyrozyny	- 4,6	20,6	23,0	
Szlak pentozofosforanowy	- 4,96	- 7,82	- 7,98	

Analiza ścieżek metabolicznych indukowanych w szczepie dzikim mc^2 155 i szczepach delecyjnych Δ*mtrA* i Δ*glnR* poddanych analizie RNA-seq w warunkach głodu azotowego

Niedobory azotu w środowisku wzrostu zmuszają komórkę bakteryjną do modyfikacji procesów metabolicznych zachodzących w komórce. W związku z tym, możemy założyć, że zmiany obserwowane w analizach porównawczych przedstawionych dla szczepu kontrolnego oraz szczepów mutantów na podłożu minimalnym z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu wynikają z globalnej odpowiedzi komórki na głodzenie azotowe. Komórki pozbawione źródła azotu znajdują się w warunkach głodu azotowego i dostosowują odpowiednio swój metabolizm. Stąd też obserwujemy liczne zmiany w poziomie ekspresji genów, wpływających na procesy metaboliczne komórki, a które zostały wyszczególnione w kolumnach A, B i C **Tabeli 38**. W dalszej części dokonuję szerszej charakterystyki wybranych procesów ze wskazaniem enzymów, których ekspresja uległa zmianie w badanych warunkach.

Biosynteza argininy

Jak już wspomniano arginina zaliczana jest do aminokwasów zasadowych, a w jej budowie można wyróżnić łańcuch boczny obdarzony ładunkiem dodatnim. Arginina uczestniczy w procesach prowadzących do powstania α-ketoglutaranu i odgrywa ważną rolę w metabolizmie azotu.



MSMEG_3226	MSMEG_2189
MSMEG_2491	MSMEG_6693
MSMEG_2187	

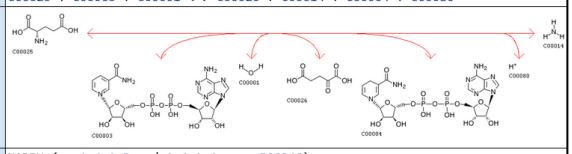
MSMEG_4290	MSMEG_1093
MSMEG_6260	MSMEG_1094
MSMEG_4294	

Rycina 41. Szlaki metaboliczne przemian argininy z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. ◯ – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, ◯ – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 39. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm argininy zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Biosynteza argininy

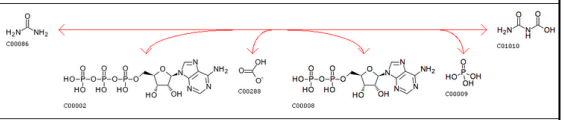
M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_3226	-	Syntaza glutaminianowa, NADH/nadph, mała podjednostka	4,14	-	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155

Entry	R00243 Reaction
Name	L-glutamate:NAD+ oxidoreductase (deaminating)
Definition	L-Glutamate + NAD+ + H2O <=> 2-Oxoglutarate + Ammonia + NADH + H+
Equation	C00025 + C00003 + C00001 <=> C00026 + C00014 + C00004 + C00080
	
Comment	NADPH (ec 1.4.1.3 and 1.4.1.4, see R00248)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00006 C00025_C00026 RC02799 C00014_C00025
Enzyme	1.4.1.2 1.4.1.3 1.4.1.14
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00430 Taurine and hypotaurine metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.4.1.2
- dehydrogenaza glutaminianowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian
  - H_2O
  - NAD+
- produkty:
  - 2-oksoglutaran
  - NH_3
  - NADH
  - H+

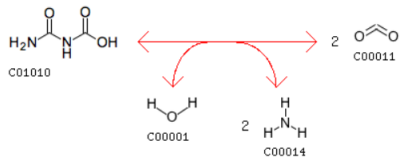
Enzym: EC 1.4.1.3
- dehydrogenaza glutaminianowa [NAD(P)+]
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian
  - H_2O
  - NAD+
  - NADP+
- produkty:

			2-oksoglutaran NH_3 NADH NADPH H+		
MSMEG_2187	-	Amidoliaza mocznikowa	7,56	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR

Entry	R00774 Reaction
Name	Urea:carbon-dioxide ligase (ADP-forming)
Definition	ATP + Urea + HCO3- <=> ADP + Orthophosphate + Urea-1-carboxylate
Equation	C00002 + C00086 + C00288 <=> C00008 + C00009 + C01010
	
Reaction class	RC00002 C00002_C00008 RC00378 C00086_C01010
Enzyme	6.3.4.6
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00791 Atrazine degradation rn01100 Metabolic pathways

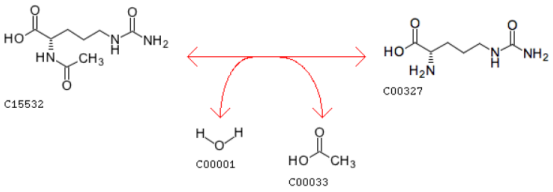
Enzym: EC 6.3.4.6
- karboksylaza mocznikowa
- ligaza
- substraty:
  - ATP
  - mocznik
  - HCO_3^-
- produkty:
  - ADP
  - fosforan
  - mocznik-1-karboksylan

MSMEG_2189 (atzF)	-	Hydrolaza allofanianowa	6,0	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR

Entry	R00005 Reaction
Name	urea-1-carboxylate amidohydrolase
Definition	Urea-1-carboxylate + H2O <=> 2 CO2 + 2 Ammonia
Equation	C01010 + C00001 <=> 2 C00011 + 2 C00014
	
Comment	The yeast enzyme (but not that from green algae) also catalyses the reaction of EC 6.3.4.6 urea carboxylase, thus bringing about the hydrolysis of urea to CO2 and NH3 in the presence of ATP and bicarbonate. R00774 (6.3.4.6)
Reaction class	RC02756 C00011_C01010
Enzyme	3.5.1.54
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00791 Atrazine degradation rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 3.5.1.54
- hydrolaza allofanianowa
- hydrolaza
- substraty:
  - H_2O
  - mocznik-1-karboksylan
- produkty:
  - CO_2
  - NH_3

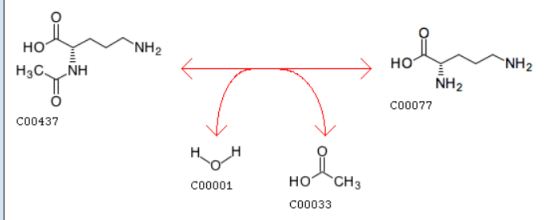
MSMEG_2491	-	Deacetylaza acetylonityny	7,6	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR

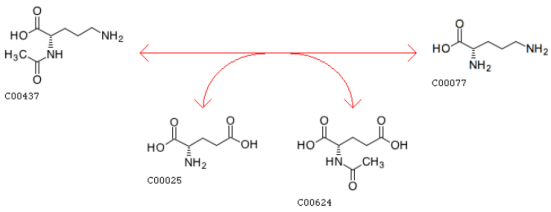
Entry	R09107 Reaction
Name	N-acetyl-L-citrulline amidohydrolase
Definition	N-Acetyl-L-citrulline + H2O <=> Acetate + L-Citrulline
Equation	C15532 + C00001 <=> C00033 + C00327
	
Reaction class	RC00064 C00327_C15532 RC00300 C00033_C15532
Enzyme	3.5.1.16
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 3.5.1.14
- amidohydrolaza N-acylo-alifatyczno-L-aminokwasowa
- hydrolaza
- substraty:
  - N-acylo-alifatyczny-L-aminokwas
  - H_2O
  - koniugat N-acetylo-L-cysteiny-S
- produkty:
  - alifatyczny L-aminokwas
  - karboksylan
  - koniugat L-cysteiny-S
  - octan

Enzym: EC 3.5.1.16
- deacetylaza acetylonityny
- hydrolaza
- substraty:
  - N2-acetylo-L-ornityna
  - H_2O
- produkty:
  - octan
  - L-ornityna

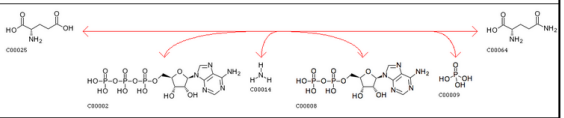
Enzym: EC 3.5.1.35
- glutaminian N-acetylotransferazy

Entry	R00669 Reaction
Name	N2-Acetyl-L-ornithine amidohydrolase
Definition	N-Acetylornithine + H2O <=> Acetate + L-Ornithine
Equation	C00437 + C00001 <=> C00033 + C00077
	
Reaction class	RC00064 C00077_C00437 RC00300 C00033_C00437
Enzyme	3.5.1.14 3.5.1.16
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

Entry	R02282 Reaction
Name	N2-Acetyl-L-ornithine:L-glutamate N-acetyltransferase
Definition	N-Acetylornithine + L-Glutamate <=> L-Ornithine + N-Acetyl-L-glutamate
Equation	C00437 + C00025 <=> C00077 + C00624
	
Reaction class	RC00064 C00025_C00624 C00077_C00437
Enzyme	2.3.1.35
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism rn01230 Biosynthesis of amino acids

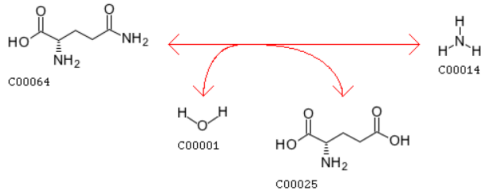
- transferaza
- substraty:
  - N2-acetylo-L-ornityna L-glutaminian
- produkty:
  - L-ornityna
  - N-acetylo-L-glutaminian

MSMEG_6693	-	Syntetaza glutaminy III	4,86	-	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155
			6,22	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
MSMEG_4290 (glnA)	Rv2220	Syntetaza glutaminy typu I	12,34	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,64	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155
MSMEG_6260 (glnT)	-	Syntetaza glutaminy, typ III	11,42	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,26	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155
MSMEG_4294 (glnA)	-	Syntetaza glutaminy typu I	8,88	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 8,84	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155

Entry	R00253 Reaction
Name	L-Glutamate:ammonia ligase (ADP-forming)
Definition	ATP + L-Glutamate + Ammonia <=> ADP + Orthophosphate + L-Glutamine
Equation	C00002 + C00025 + C00014 <=> C00008 + C00009 + C00064
	
Reaction class	RC00002 C00002_C00008 RC00010 C00025_C00064 RC02798 C00014_C00064
Enzyme	6.3.1.2
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 6.3.1.2
- syntetaza glutaminy
- ligaza
- substraty:
  - ATP
  - L-glutaminian
  - NH_3
- produkty:
  - ADP
  - fosforan
  - L-glutamina

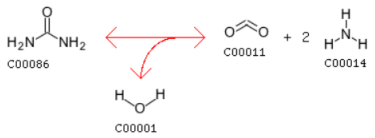
Enzym: EC 3.5.1.2
- glutaminaza
- hydrolaza
- substraty:

Entry	R00256 Reaction
Name	L-glutamine amidohydrolase
Definition	L-Glutamine + H2O <=> L-Glutamate + Ammonia
Equation	C00064 + C00001 <=> C00025 + C00014
	
Comment	ec 2.6.1.85 (see R01716, R00256+R05552) ec 6.3.4.2 (see R00573, R00256+R00571) ec 6.3.5.4 (see R00578, R00256+R00483) ec 6.3.5.5 (see R00575, R00256+R10948+R10949+R01395) ec 2.6.1.123 (see R12939, R00256+R12937+R12938)
Reaction class	RC00010 C00025_C00064 RC02798 C00014_C00064
Enzyme	1.4.1.13 1.4.1.14 1.4.7.1 2.6.1.85 2.6.1.123 3.5.1.2 3.5.1.38 4.3.2.10 4.3.3.6 6.3.4.2 6.3.5.2 6.3.5.4 6.3.5.5 6.3.5.13
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn01100 Metabolic pathways

L-glutamina
H_2O
- produkty:
L-glutaminian
NH_3

Enzym: EC 3.5.1.38
- glutamin-(asparagin-)aza
- hydrolaza
- substraty:
L-glutamina
H_2O
L-asparagina
- produkty:
L-glutaminian
NH_3
L-asparaginian

MSMEG_1093	-	Podjednostka gamma/beta ureazy	-	- 4,94	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155
			10,3	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 15,22	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155
			4,46	-	1 mM MtrA/GlnR vs 1 mM GlnR
MSMEG_1094 (ureC)	-	Ureaza, podjednostka alfa	6,6	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,08	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155

Entry	R00131 Reaction
Name	Urea amidohydrolase
Definition	Urea + H2O <=> CO2 + 2 Ammonia
Equation	C00086 + C00001 <=> C00011 + 2 C00014
	
Reaction class	RC02798 C00014_C00086 RC02806 C00011_C00086
Enzyme	3.5.1.5
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00230 Purine metabolism rn00791 Atrazine degradation rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

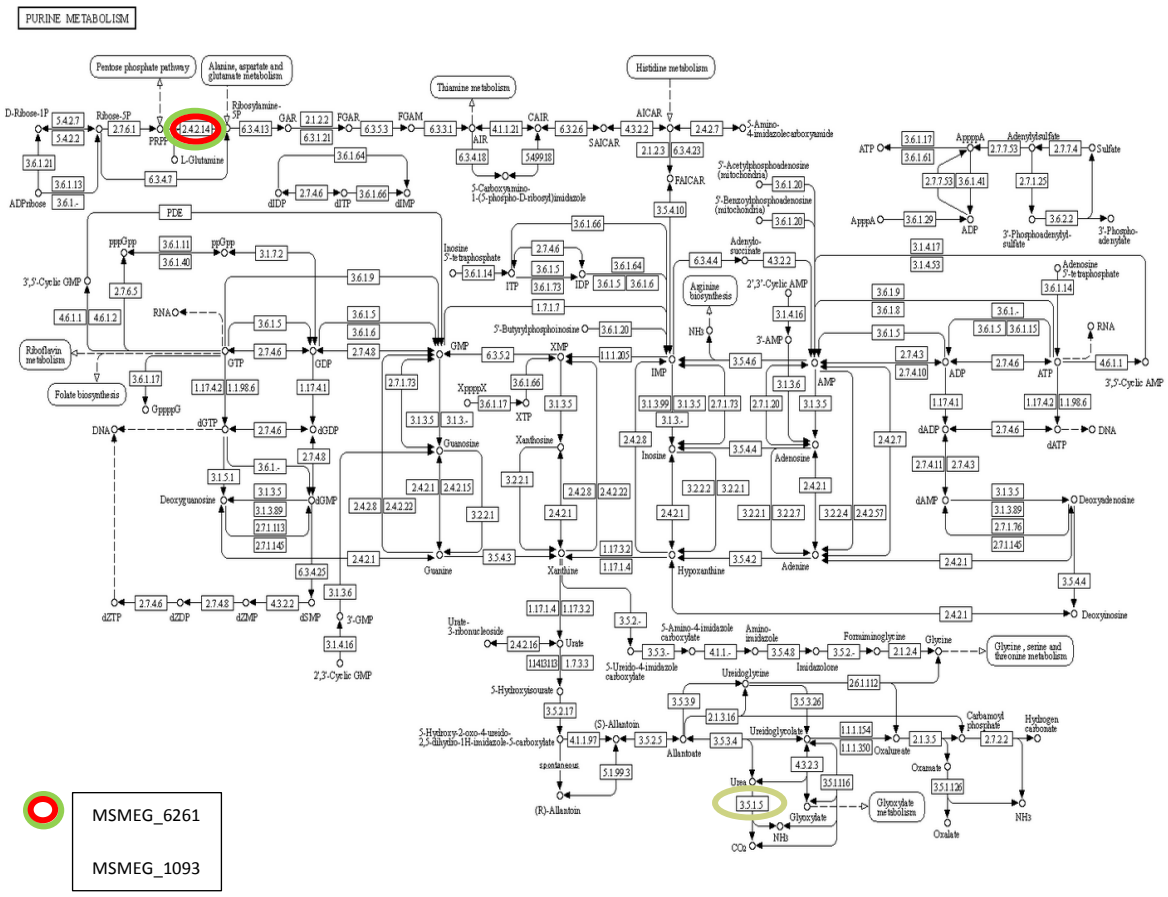
Enzym: EC 3.5.1.5
- ureaza
- ligaza
- substraty:
mocznik
H_2O
- produkty:
CO_2
NH_3

Przeprowadzone analizy transkryptomiczne dla badanych szczepów rosnących na podłożu minimalnym Sauton z dodatkiem 1 mM siarczanu amonu, wykazały znaczące obniżenie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę argininy: *msmeg_4290* i *msmeg_6260*, kodujących enzym syntazę glutaminy w mutancie Δ*glnR* w porównaniu do szczepu „dzikiego" oraz mutanta Δ*mtrA.* Ekspresja genu *msmeg_1093* kodującego enzym ureazę była obniżona w stosunku do szczepu „dzikiego" zarówno w mutancie Δ*glnR* jak i Δ*mtrA,* a w szczepie pozbawionym obu badanych białek regulatorowych była wyższa niż w pojedynczym mutancie Δ*glnR* (**Tabela 39., Rycina 41.**). Przeprowadzona analiza wykazała również obniżony poziom ekspresji genów *msmeg_4290*, *msmeg_6260*, *msmeg_4294*,

msmeg_1093 oraz *msmeg_1094* w mutancie Δ*glnR* w porównaniu do szczepu „dzikiego” oraz mutanta Δ*mtrA*.

Metabolizm puryn

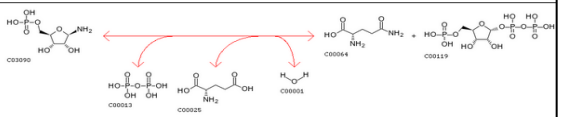
Metabolizm puryn jest jednym z podstawowych procesów komórkowych, mających duże znaczenie dla życia licznych organizmów, w tym drobnoustrojów. Nukleotydy purynowe wymagane są m.in. w syntezie DNA i RNA, oraz pełnią liczne funkcje w komórkach, wpływając na regulację enzymów (Parker i Long, 2007).



Rycina 42. Szlaki metaboliczne przemian puryn z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. ○ – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, ○ – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

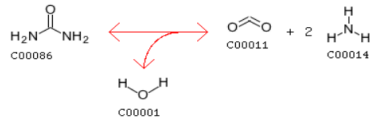
Tabela 40. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm puryn zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm puryn					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_6261	-	Amidotransferaza glutaminy, klasa II	12,56	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,08	1 mM GlnR vs 1mM mc2 155

Entry	R01072 Reaction
Name	5-phosphoribosylamine:diphosphate phospho-alpha-D-ribosyltransferase (glutamate-amidating)
Definition	5-Phosphoribosylamine + Diphosphate + L-Glutamate <=> L-Glutamine + 5-Phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate + H2O
Equation	C03090 + C00013 + C00025 <=> C00064 + C00119 + C00001
	
Reaction class	RC00010 C00025_C00064 RC02724 C00119_C03090 RC02752 C00064_C03090
Enzyme	2.4.2.14
Pathway	rn00230 Purine metabolism rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites

Enzym: EC 2.4.2.14
- amidofosforybozylotransferaza
- transferaza
- substraty:
  - 5-fosfo-beta-D-rybozyloamina difosforan
  - L-glutaminian
- produkty:
  - L-glutamina
  - 5-fosfo-alfa-D-rybozo-1-difosforan
  - H_2O

MSMEG_1093	-	Podjednostka gamma/beta ureazy	-	- 4,94	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155
			4,46	-	1 mM MtrA/GlnR vs 1 mM GlnR

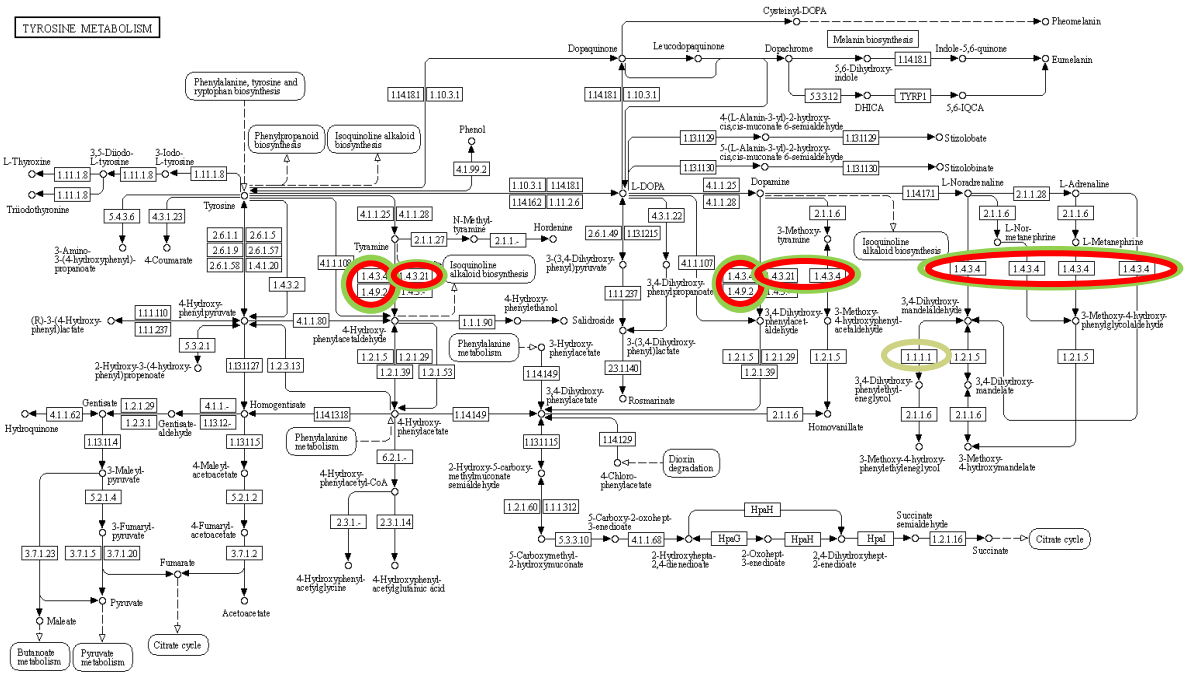
Entry	R00131 Reaction
Name	Urea amidohydrolase
Definition	Urea + H2O <=> CO2 + 2 Ammonia
Equation	C00086 + C00001 <=> C00011 + 2 C00014
	
Reaction class	RC02798 C00014_C00086 RC02806 C00011_C00086
Enzyme	3.5.1.5
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00230 Purine metabolism rn00791 Atrazine degradation rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 3.5.1.5
- ureaza
- ligaza
- substraty:
  - mocznik
  - H_2O
- produkty:
  - CO_2
  - NH_3

Uzyskane dane transkryptomiczne wskazują na znaczącą rolę białka GlnR w metabolizmie puryn. W warunkach głodu azotowego odnotowano niższy poziom ekspresji genu msmeg_*6261,* kodującego enzym amidofosforybozylotransferazę, biorącą udział w wytwarzaniu L-glutaminy, w szczepie mutancie Δ*glnR* zarówno w porównaniu do szczepu „dzikiego" jak i mutanta Δ*mtrA*, (**Tabela 40.**, **Rycina 42.**).

Metabolizm tyrozyny

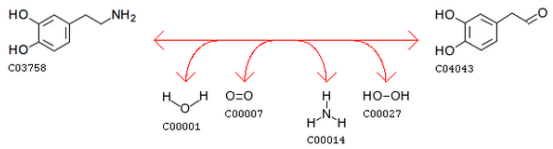
Tyrozyna zaliczana do grupy aminokwasów aromatycznych, w których jeden z atomów wodoru w alaninie jest zastąpiony przez pierścień aromatyczny, bierze udział w metabolizmie azotu w komórkach drobnoustrojów.



Rycina 43. Szlaki metaboliczne przemian tyrozyny z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. ◯ – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, ◯ – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 41. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm tyrozyny zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm tyrozyny					
M. smegmatis	**Rv**	**Produkt**	**Up**	**Down**	**Układ eksperymentalny**
MSMEG_2526	-	Oksydaza miedziowo-metyloaminowa	23,0	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 20,6	1 mM GlnR vs 1mM mc2 155
			Enzym: EC 1.4.3.4 - oksydaza monoaminowa - oksydoreduktaza - substraty: RCH_2NHR'		

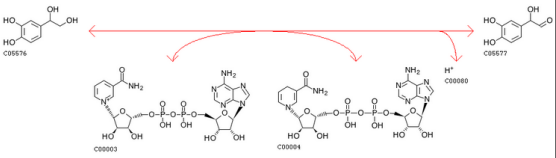
Entry	R04300 Reaction
Name	4-(2-aminoethyl)-1,2-benzenediol:oxygen oxidoreductase(deaminating) (flavin-containing)
Definition	Dopamine + H2O + Oxygen <=> 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde + Ammonia + Hydrogen peroxide
Equation	C03758 + C00001 + C00007 <=> C04043 + C00014 + C00027
	
Reaction class	RC00062 C03758_C04043 RC02755 C00007_C00027
Enzyme	1.4.3.4 1.4.3.21 1.4.3.- 1.4.9.2
Pathway	rn00350 Tyrosine metabolism rn00950 Isoquinoline alkaloid biosynthesis rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites

H_2O
O_2
- produkty:
  $RCHO$
  $R'NH_2$
  H_2O_2

Enzym: EC 1.4.3.21
- oksydaza pierwszorzędowej aminy
- oksydoreduktaza
- substraty:
  RCH_2NH_2
  H_2O
  O_2
- produkty:
  $RCHO$
  NH_3
  H_2O_2

Enzym: EC 1.4.9.2
- dehydrogenaza aralkiloaminowa (azuryna)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  $ArCH_2NH_2$
  H_2O
  azuryt
- produkty:
  $ArCHO$
  NH_3
  zredukowana azuryna

MSMEG_3615	Rv1862	Białko rodziny dehydrogenaz alkoholowych wiążących cynk	-	- 4,6	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155

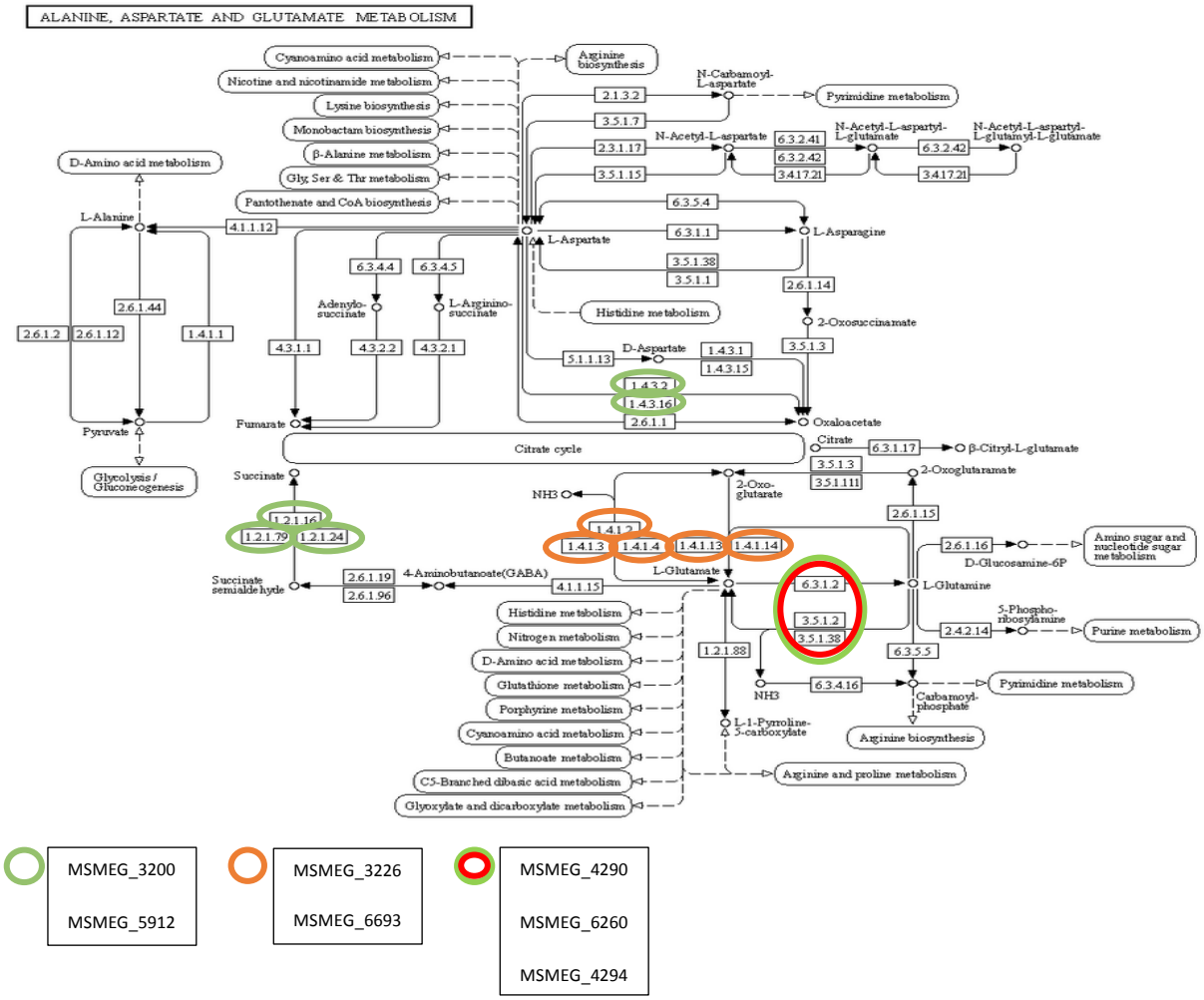
Entry	R04880 Reaction
Name	3,4-dihydroxyphenylethyleneglycol:NAD+ oxidoreductase
Definition	3,4-Dihydroxyphenylethyleneglycol + NAD+ <=> 3,4-Dihydroxymandelaldehyde + NADH + H+
Equation	C05576 + C00003 <=> C05577 + C00004 + C00080
	
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00099 C05576_C05577
Enzyme	1.1.1.1
Pathway	rn00350 Tyrosine metabolism rn01100 Metabolic pathways

Enzym: EC 1.1.1.1
- dehydrogenaza alkoholowa (ADH)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  alkohol pierwszorzędowy
  NAD+
  alkohol drugorzędny
- produkty:
  aldehyd
  NADH
  H+
  keton

Uzyskane dane transkryptomiczne wskazują na znaczącą rolę białka GlnR w metabolizmie tyrozyny. W warunkach głodu azotowego odnotowano niższy poziom ekspresji genu msmeg_*2526* w szczepie mutancie Δ*glnR* zarówno w porównaniu do szczepu „dzikiego" jak i mutanta Δ*mtrA*, (**Tabela 41.**, **Rycina 43.**). W przypadku genu kodującego enzym oksydazę monoaminową, doszło również do znacznego obniżenia jego poziomu ekspresji w szczepie mutancie Δ*glnR*, w sytuacji gdy zestawiono ze sobą wyniki uzyskane dla tego mutanta oraz szczepu dzikiego (**Tabela 41.**, **Rycina 43.**). Natomiast porównanie danych transkryptomicznych mutanta Δ*mtrA* i szczepu „dzikiego" wykazało znaczące obniżenie ekspresji genu *msmeg_3615* kodującego dehydrogenazę alkoholową przy braku funkcjonalnego białka MtrA (**Tabela 41.**, **Rycina 43**).

Metabolizm alaniny, asparaginianu i glutaminianu

Aminokwasy takie jak alanina, asparaginian czy glutaminian są przede wszystkim elementami wchodzącymi w skład peptydów, w związku z czym odgrywają kluczową rolę w metabolizmie podstawowym, wpływając w sposób bezpośredni lub pośredni na procesy zachodzące w komórkach bakteryjnych.

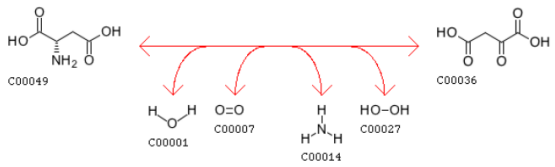


Rycina 44. Szlaki metaboliczne przemian alaniny, asparaginianu i glutaminianu z uwzględnieniem enzymów regulujących te szlaki. – geny ulegające indukcji oraz kodowane przez nie enzymy, – geny ulegające represji oraz kodowane przez nie enzymy.

Tabela 42. Charakterystyka reakcji enzymatycznych regulujących metabolizm alaniny, asparaginianu i glutaminianu zachodzących w komórkach *M. smegmatis*, przeprowadzona z wykorzystaniem platformy KEGG.

Metabolizm alaniny, asparaginianu i glutaminianu

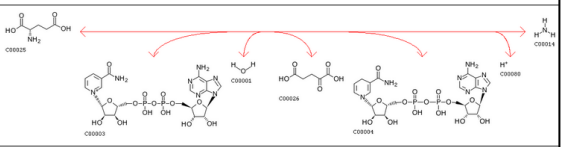
M. smegmatis	Rv	Produkt	Up	Down	Układ eksperymentalny
MSMEG_3200 (nadB)	Rv1595	Oksydaza L-asparaginianowa	-	- 6,1	1 mM MtrA vs 1mM GlnR

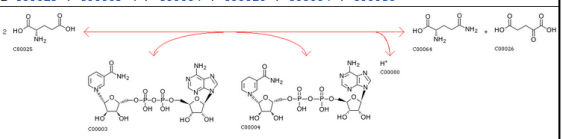
Entry	R00357 Reaction
Name	L-Aspartic acid:oxygen oxidoreductase (deaminating)
Definition	L-Aspartate + H2O + Oxygen <=> Oxaloacetate + Ammonia + Hydrogen peroxide
Equation	C00049 + C00001 + C00007 <=> C00036 + C00014 + C00027
	
Comment	see R00359
Reaction class	RC00006 C00036_C00049 RC02755 C00007_C00027 RC02799 C00014_C00049
Enzyme	1.4.3.2 1.4.3.16
Pathway	rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn01100 Metabolic pathways

Enzym: EC 1.4.3.2
- oksydaza L-aminokwasów
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-aminokwas
  - H_2O
  - O_2
- produkty:
  - 2-okso karboksylan
  - NH_3
  - H_2O_2

Enzym: EC 1.4.3.16
- Oksydaza L-asparaginianowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-asparaginian
  - O_2
- produkty:
  - iminobursztynian
  - H_2O_2

MSMEG_3226	-	Syntaza glutaminianowa, NADH/nadph, mała podjednostka	4,41	-	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155

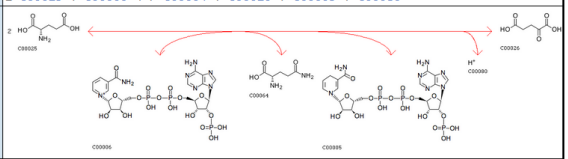
Entry	R00243 Reaction
Name	L-glutamate:NAD+ oxidoreductase (deaminating)
Definition	L-Glutamate + NAD+ + H2O <=> 2-Oxoglutarate + Ammonia + NADH + H+
Equation	C00025 + C00003 + C00001 <=> C00026 + C00014 + C00004 + C00080
	
Comment	NADPH (ec 1.4.1.3 and 1.4.1.4, see R00248)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00006 C00025_C00026 RC02799 C00014_C00025
Enzyme	1.4.1.2 1.4.1.3 1.4.1.14
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00430 Taurine and hypotaurine metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Entry	R00093 Reaction
Name	L-glutamate:NAD+ oxidoreductase (transaminating)
Definition	2 L-Glutamate + NAD+ <=> L-Glutamine + 2-Oxoglutarate + NADH + H+
Equation	2 C00025 + C00003 <=> C00064 + C00026 + C00004 + C00080
	
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00006 C00025_C00026 RC00010 C00025_C00064
Enzyme	1.4.1.14
Pathway	rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.4.1.2
- dehydrogenaza glutaminianowa
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian
  - H_2O
  - NAD+
- produkty:
  - 2-oksoglutaran
  - NH_3
  - NADH
  - H+

Enzym: EC 1.4.1.4
- dehydrogenaza glutaminianowa (NADP+)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian
  - H_2O
  - NADP+
- produkty:
  - 2-oksoglutaran
  - NH_3
  - NADPH
  - H+

Enzym: EC 1.4.1.3
- dehydrogenaza glutaminianowa [NAD(P)+]
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - L-glutaminian
  - H_2O
  - NAD+
  - NADP+
- produkty:

Entry	R00114 Reaction
Name	L-glutamate:NADP+ oxidoreductase (transaminating)
Definition	2 L-Glutamate + NADP+ <=> L-Glutamine + 2-Oxoglutarate + NADPH + H+
Equation	2 C00025 + C00006 <=> C00064 + C00026 + C00005 + C00080
	
Comment	two-step reaction (see R00256+R00248)
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00006 C00025_C00026 RC00010 C00025_C00064
Enzyme	1.4.1.13
Pathway	rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01110 Biosynthesis of secondary metabolites rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01230 Biosynthesis of amino acids

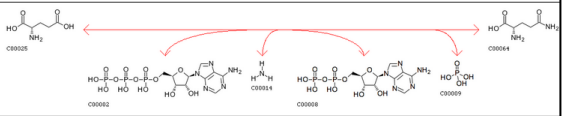
2-oksoglutaran
NH_3
NADH
NADPH
H+

Enzym: EC 1.4.1.13
- syntaza glutaminianowa (NADPH)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  L-glutaminian
  H_2O
  NH_3
  NADP+
- produkty:
  L-glutamina
  2-oksoglutaran
  NADPH
  H+
  H_2O
  NH_3

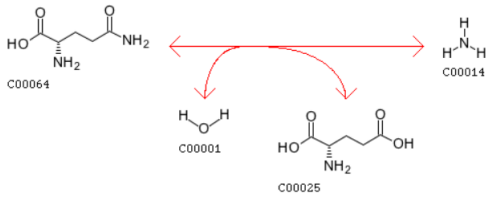
Enzym: EC 1.4.1.14
- syntaza glutaminianowa (NADH)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  L-glutaminian
  H_2O
  NH_3
  NAD+
- produkty:
  L-glutamina
  2-oksoglutaran
  NADH
  H+
  H_2O
  NH_3

MSMEG_6693	-	Syntetaza glutaminy III	4,86	-	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155
			6,22	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
MSMEG_4290 (glnA)	Rv2220	Syntetaza glutaminy typu I	12,34	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,64	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155
MSMEG_6260 (glnT)	-	Syntetaza glutaminy, typ III	11,42	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 10,26	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155
MSMEG_4294 (glnA)	-	Syntetaza glutaminy typu I	8,88	-	1 mM MtrA vs 1mM GlnR
			-	- 8,84	1 mM GlnR vs 1 mM mc2 155

Enzym: EC 6.3.1.2
- syntetaza glutaminy
- ligaza
- substraty:
  ATP
  L-glutaminian
  NH_3
- produkty:
  ADP
  fosforan
  L-glutamina

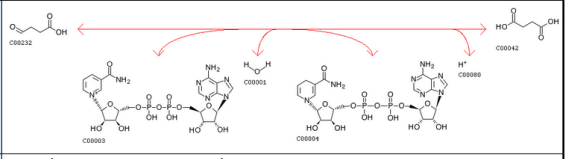
Entry	R00253 Reaction
Name	L-Glutamate:ammonia ligase (ADP-forming)
Definition	ATP + L-Glutamate + Ammonia <=> ADP + Orthophosphate + L-Glutamine
Equation	C00002 + C00025 + C00014 <=> C00008 + C00009 + C00064
	
Reaction class	RC00002 C00002_C00008 RC00010 C00025_C00064 RC02798 C00014_C00064
Enzyme	6.3.1.2
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism rn00910 Nitrogen metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments rn01230 Biosynthesis of amino acids

Enzym: EC 3.5.1.2
- glutaminaza
- hydrolaza
- substraty:
  - L-glutamina
  - H_2O
- produkty:
  - L-glutaminian
  - NH_3

Entry	R00256 Reaction
Name	L-glutamine amidohydrolase
Definition	L-Glutamine + H2O <=> L-Glutamate + Ammonia
Equation	C00064 + C00001 <=> C00025 + C00014
	
Comment	ec 2.6.1.85 (see R01716, R00256+R05552) ec 6.3.4.2 (see R00573, R00256+R00571) ec 6.3.5.4 (see R00578, R00256+R00483) ec 6.3.5.5 (see R00575, R00256+R10948+R10949+R01395) ec 2.6.1.123 (see R12939, R00256+R12937+R12938)
Reaction class	RC00010 C00025_C00064 RC02798 C00014_C00064
Enzyme	1.4.1.13 1.4.1.14 1.4.7.1 2.6.1.85 2.6.1.123 3.5.1.2 3.5.1.38 4.3.2.10 4.3.3.6 6.3.4.2 6.3.5.2 6.3.5.4 6.3.5.5 6.3.5.13
Pathway	rn00220 Arginine biosynthesis rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn01100 Metabolic pathways

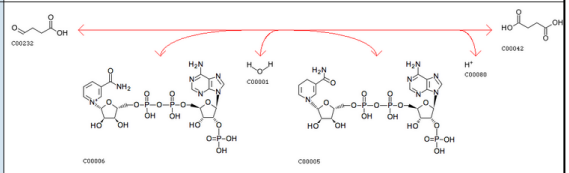
Enzym: EC 3.5.1.38
- glutamin-(asparagin-)aza
- hydrolaza
- substraty:
  - L-glutamina
  - H_2O
  - L-asparagina
- produkty:
  - L-glutaminian
  - NH_3
  - L-asparaginian

MSMEG_5912	Rv1731	Dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego	-	- 7,96	1 mM MtrA vs 1mM mc2 155
			-	- 7,82	1 mM MtrA vs 1mM GlnR

Entry	R00713 Reaction
Name	succinate-semialdehyde:NAD+ oxidoreductase
Definition	Succinate semialdehyde + NAD+ + H2O <=> Succinate + NADH + H+
Equation	C00232 + C00003 + C00001 <=> C00042 + C00004 + C00080
	
Comment	NADP+ (ec 1.2.1.16, see R00714)
Reaction class	RC00001 C00003_C00004 RC00080 C00042_C00232
Enzyme	1.2.1.16 1.2.1.24
Pathway	rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00350 Tyrosine metabolism rn00650 Butanoate metabolism rn00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.2.1.16
- dehydrogenaza bursztynianowo-semialdehydowa [NAD(P)+]
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - semialdehyd bursztynianowy
  - NAD+
  - NADP+
  - H_2O
- produkty:
  - bursztynian
  - NADH
  - NADPH
  - H+

Enzym: EC 1.2.1.24
- dehydrogenaza bursztynianowo-semialdehydowa (NAD+)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - semialdehyd bursztynianowy
  - NAD+
  - H_2O
- produkty:
  - bursztynian
  - NADH
  - H+

Entry	R00714 Reaction
Name	succinate-semialdehyde:NADP+ oxidoreductase
Definition	Succinate semialdehyde + NADP+ + H2O <=> Succinate + NADPH + H+
Equation	C00232 + C00006 + C00001 <=> C00042 + C00005 + C00080
	
Comment	NADH (see R00713)
Reaction class	RC00001 C00005_C00006 RC00080 C00042_C00232
Enzyme	1.2.1.16 1.2.1.79
Pathway	rn00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism rn00350 Tyrosine metabolism rn00650 Butanoate metabolism rn00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism rn01100 Metabolic pathways rn01120 Microbial metabolism in diverse environments

Enzym: EC 1.2.1.79
- dehydrogenaza bursztynianowo-semialdehydowa (NADP+)
- oksydoreduktaza
- substraty:
  - semialdehyd bursztynianowy
  - NADP+
  - H_2O
- produkty:
  - bursztynian
  - NADPH
  - H+

Analiza transkryptomiczna szczepów hodowanych w warunkach niedoboru azotu wykazała znacznie obniżony poziom ekspresji genów *msmeg_4290, msmeg_4294* oraz *msmeg_6260* w szczepie Δ*glnR* w porównaniu do szczepu dzikiego oraz mutanta Δ*mtrA* (**Tabela 42., Rycina 44.**). W szczepie pozbawionym funkcjonalnego białka MtrA nastąpiło natomiast znaczące obniżenie ekspresji genu *msmeg_5912* kodującego dehydrogenaza semialdehydu bursztynowego w porównaniu zarówno do szczepu „dzikiego" jak i mutanta Δ*glnR* (**Tabela 42., Rycina 44.**).

6. Dyskusja

W celu przystosowania się do zmiennych i często niesprzyjających warunków środowiska, bakterie wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych. Jak wskazują najnowsze badania, ważną rolę w adaptacji bakterii do zmieniających się warunków, odgrywają dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs). W większości przypadków, w skład systemów TCSs wchodzi kinaza histydynowa, zazwyczaj zakotwiczona w błonie i odbierająca docierające z zewnątrz sygnały, oraz białko regulatorowe, modyfikujące ekspresję docelowych genów (Simcox i wsp., 2023). Regulacja mechanizmów przystosowawczych ma szczególnie znaczenie w przypadku bakterii patogennych, do których zaliczamy *M. tuberculosis*, będący czynnikiem etiologicznym gruźlicy (Rahlwes i wsp., 2023).

Jednym z głównych celów realizowanych badań było określenie roli dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MSMEG_6236/MSMEG_6238 występującego u szybkorosnących prątków *M. smegmatis*. W celu określenia funkcji, jaką odgrywa wyżej wymieniony system w globalnej regulacji metabolizmu u *M. smegmatis* w ramach przeprowadzonych badań skonstruowano ukierunkowane mutanty *M. smegmatis* pozbawione funkcjonalnych genów tj. *msmeg_6236*, *msmeg_6238* oraz *msmeg_6236/msmeg_6238*. Uzyskanie mutantów typu „knock down" wykazało, iż analizowane geny nie są niezbędne do przeżycia prątków *M. smegmatis* w warunkach laboratoryjnych.

W okresie obejmującym realizację badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, ukazał się artykuł identyfikujący system MnoSR, jako TCS (Dubey i Jain, 2019). W badaniach tych wykazano, iż kinaza MnoS ulega autofosforylacji i poprzez aktywność fosfotransferazy indukuje białko regulatorowe MnoR w komórkach *M. smegmatis* (Dubey i Jain, 2019). Ponadto, okazało się iż system MnoSR reguluje ekspresję dehydrogenazy metanolowej (Mno) oraz wpływa na ekspresję genu *msmeg_6239*, który koduje przypuszczalną dehydrogenazę 1,3-propanadiolu. Uzyskane przez zespół Dubey`a i Jain`a dane wskazują na brak zdolności szczepu pozbawionego systemu MnoSR do wzrostu w obecności metanolu i 1,3-propanadiolu stanowiących jedyne źródło węgla, co wskazuje na rolę systemu MnoSR w metabolizmie alkoholi (Dubey i Jain, 2019). Biorąc pod uwagę opublikowane dane, postanowiliśmy przeprowadzić analizę kinetyki wzrostu uzyskanych mutantów *M. smegmatis* w obecności 1,3-propanadiolu, metanolu i etanolu stanowiących

jedyne źródła węgla. Przeprowadzone analizy, wykazały istotne statystycznie obniżenie tempa wzrostu szczepów mutantów Δ*msmeg_6236*, Δ*msmeg_6238* oraz Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238)* w porównaniu do szczepu dzikiego mc^2 155 w obecności 1,3-propanadiolu stanowiącego jedyne źródło węgla, co potwierdziło udział MnoSR w regulacji metabolizmu 1,3-propanadiolu. W przypadku zastosowanie metanolu, efekt zahamowania wzrostu mutantów był trudniej zauważalny ze względu na bardzo ograniczony wzrost szczepu kontrolnego na podłożu z 2% metanolem, oraz brak wzrostu na podłożu z 1% metanolem. Znaczące różnice we wzroście szczepów mutantów oraz szczepu kontrolnego zaobserwowano natomiast stosując jako jedyne źródło węgla dodatek etanolu co wskazuje, że zdolność do metabolizmu tego alkoholu jest regulowana przez MnoSR. Analizy wzrostu poszczególnych mutantów na podłożu z dodatkiem etanolu lub 1,3-propandiolu wykazały, że za brak zdolności do wykorzystania obecnych w podłożu źródeł węgla odpowiada defektywny gen *msmeg_6236* gdyż brak wzrostu charakteryzował wyłącznie mutanty Δ*msmeg_6236* oraz Δ(*msmeg_6236/msmeg_6238)* lecz nie mutanta Δ*msmeg_6238.* Gen *msmeg_6238* koduje enzym o aktywności kinazy zdolnej do fosforylacji produktu genu *msmeg_6236*, można więc założyć, że funkcjonalność MnoR jako regulatora metabolizmu alkoholi nie wymaga fosforylacji, bądź że białko to może ulegać w komórce fosforylacji przez inną kinazę. Zjawisko krzyżowej fosforylacji wykazano dla innych mykobakteryjnych białek regulatorowych systemów TCSs. W warunkach in vitro wykazano, że PrrA i MprA ulegają fosforylacji przez kinazę PrrB, KdpE i TcrA aktywowane są przez KdpD, a kinaza MtrB przekazującą grupę fosforanową na MtrA KdpE, TcrA, TcrX, PhoP i NarL (Agrawal i wsp., 2015).

Jednym z głównych czynników wpływających na wzrost drobnoustrojów jest dostępność składników odżywczych. Patogenne szczepy *M. tuberculosis* zlokalizowane w makrofagach i narażone na działanie czynników stresowych takich jak niedotlenienie, zakwaszenie czy stres oksydacyjny wykazują zdolność do współmetabolizowania wielu substratów węglowych wewnątrz komórek gospodarza, co wpływa na ich zdolność infekcji gospodarza (Xu i wsp., 2022). Ze względu na duże zdolności adaptacyjne komórek prątków do zmieniających się warunków środowiska oraz zdolność do regulacji procesów metabolicznych zachodzących w ich komórkach, postanowiono przeanalizować zdolność uzyskanych szczepów mutantów *M. smegmatis* do wykorzystania określonych cukrów prostych i dwucukrów, w warunkach stresu węglowego. Przeprowadzone analizy wykazały, że badane pod tym kątem węglowodany z wyjątkiem fruktozy są metabolizowane

w podobny sposób przez szczep kontrolny i mutanty. Fruktoza natomiast była metabolizowana znacząco wydajniej przez szczep kontrolny w porównaniu do mutanta pozbawionego funkcjonalnego białka MnoR. Wydaje się jednak, że MnoRS nie jest znacząco zaangażowany w regulację procesów katabolicznych wykorzystujących jako substrat węglowodany, bądź przynajmniej, z wyjątkiem fruktozy, nie jest niezbędny do utylizacji tych źródeł węgla.

Regulacja podstawowych procesów metabolicznych przez TCSs u mykobakterii może prowadzić do zmiany wrażliwości prątków na podstawowe leki przeciwgruźlicze. Badania przeprowadzone przez Dadurę i wsp., wykazały zwiększoną wrażliwość mutanta *M. smegmatis* pozbawionego zdolności do syntezy kinazy histydynowej PdtaS na antybiotyki aminoglikozydowe oraz tetracyklinowe (Dadura i wsp., 2017). Ponadto, wykazano, iż nadekspresja genu *rv3143*, kodującego sieroce białko regulatorowe Rv3143 (MSMEG_2064) doprowadziła do około dwukrotnego wzrostu wrażliwości szczepu *M. smegmatis* na rifampicynę (Dong i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przez Płocińską i wsp., wykazały z kolei zwiększoną oporność mutanta rv3134 na walinomycynę, antybiotyk zmieniający potencjał elektrochemiczny komórki prątków (Płocińska i wsp., 2022). Zaobserwowano także, że inaktywacja białka MtrA będącego regulatorem odpowiedzi niezbędnego u mykobakterii systemu MtrA/MtrB prowadzi do uwrażliwienia prątków na podstawowy lek przeciwgruźliczy rifampicynę (Gorla i wsp., 2018). Biorąc powyższe pod uwagę, postanowiono określić wrażliwość uzyskanych szczepów mutantów, pozbawionych funkcjonalnych genów *mnoSR* na wybrane antybiotyki. Przeprowadzone analizy wykazały, że inaktywacja systemu mnoSR nie wpływa na zmianę wrażliwości prątków na badane antybiotyki. Można zatem przypuszczać, że inaktywacja MnoSR nie wpływa znacząco na osłony komórkowe prątków w tym przepuszczalność ściany komórkowej, na funkcjonalność rybosomów, proces transkrypcji oraz nie indukuje systemów oporności wielolekowej.

W celu poznania szerszego znaczenia roli białek MSMEG_6236 i MSMEG_6238, w przemianach metabolicznych *M. smegmatis*, postanowiono przeprowadzić globalną analizę transkryptomiczną mutanta Δ(*msmeg_6236*/*msmeg_6238*), w warunkach głodu węglowego oraz w obecności glukozy lub 1,3-propanadiolu jako jedynych źródeł węgla. Przeprowadzona analiza porównawcza danych transkryptomicznych pozwoliła na wskazanie genów, których ekspresja zmieniała się w zależności od dostępności źródła węgla

(odpowiedź na głodzenie węglowe), bądź też bezpośrednio lub pośrednio w wyniku inaktywacji systemu MnoSR. Jak zakładano, największe, spośród odnotowanych różnic, dotyczyły zmian poziomu ekspresji genów związanych z odpowiedzią komórek *M. smegmatis* na warunki, będące następstwem głodzenia węglowego. Znaczne różnice w ekspresji genów zaobserwowano również porównując szczep kontrolny oraz *ΔmnoSR* rosnące w obecności 1,3-propanadiolu, co wynikało z braku zdolności szczepu mutanta do wykorzystania tego alkoholu jako źródła węgla. Obserwowane różnice w ekspresji genów u tych szczepów były więc również pochodną głodzenia węglowego mutanta. Najmniejsze różnice w poziomie ekspresji genów obserwowano u mutanta w warunkach głodzenia węglowego, zarówno z dodatkiem, jak i bez dodatku 1,3-propanadiolu. Brak zdolności do utylizacji 1,3-propanadiolu przez mutanta powodował, że w obu przypadkach mieliśmy de facto do czynienia z warunkami głodu węglowego.

Sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) jest coraz częściej stosowaną techniką w badaniach bakterii, w tym prątków gruźlicy. Zbadanie transkryptomu bakterii w określonych warunkach środowiska pozwala na lepsze zrozumienie procesu adaptacji np. podczas infekcji gospodarza oraz odpowiedzi na prowadzoną terapię. Analizy te pozwalają także zrozumieć jak poszczególne czynniki, np. zmiana dostępnego źródła węgla z węglowodanów na cholesterol wpływa na globalną rearanżację transkryptomu (Pawełczyk i wsp. 2021). Należy jednak pamiętać, że obserwowane zmiany w transkryptomie mają zarówno charakter zmian bezpośrednich, gdy badany czynnik wpływa wprost na ekspresję określonego genu, lub pośredni, np. gdy zmiana ekspresji genu nie jest bezpośrednio wynikiem inaktywacji badanego genu a pośrednim efektem zmian w poziomie ekspresji innych białek regulatorowych. Przeprowadzona w ramach wykonanej pracy doktorskiej analiza transkryptomiczna, umożliwiła wskazanie procesów metabolicznych, które w badaniach warunkach, charakteryzują się największą zmiennością wynikającą bądź z głodzenia węglowego bądź z inaktywacji systemu MnoRS. W tym drugim przypadku zmiany w poziomie ekspresji określonych genów nie oznaczają bezpośredniej ich regulacji przez regulator odpowiedzi MnoR, gdyż mogą również być efektem pośrednim i wynikać ze zmian w poziomie ekspresji innych białek regulatorowych. Identyfikacja regulonu MnoR wymagałaby przeprowadzenia analizy ChipSeq, która nie była celem niniejszej pracy doktorskiej.

W obecności 2% glukozy, w szczepie kontrolnym i u mutanta odnotowano znaczące różnice w poziomie ekspresji genu *msmeg_3934*, kodującego enzym syntetazę fosfoenolopirogronianową (PEPs). Enzym, syntetaza fosfoenolopirogronianu, bierze udział w przekształceniu pirogronianu w fosfoenolopirogronian, co stanowi niezbędny etap w procesie glukoneogenezy, w której źródłem węgla dla zachodzących przemian jest pirogronian lub mleczan. Badania przeprowadzone przez McCormick`a i Jakeman`a wykazały, iż PEPs jest niezbędna do wzrostu *E. coli* na trójwęglowych źródłach węgla, takich jak pirogronian (McCormick i Jakeman, 2015). Badania przeprowadzone przez Zhang`a i Anderson`a potwierdziły natomiast obecność genu kodującego PEPs w komórkach *M. smegmatis* oraz udział jego produktu w glukoneogenezie (Zhang i Anderson, 2012). Analiza kinetyki wzrostu w obecności pirogronianu sodu wykazała, że zarówno mutant jak i szczep kontrolny są zdolne do jego metabolizowania. Zdolność do wykorzystania pirogronianu jako źródła węgla została opisana również dla *M. tuberculosis* (Serafini i wsp., 2019). Przeprowadzone przez zespół Verma analizy szlaku przemian pirogronianu, wskazują na istnienie alternatywnych szlaków rozkładu pirogronianu w komórkach aktynobakterii (Verma i wsp., 2013). Brak różnic w kinetyce wzrostu mutantów MnoSR w odniesieniu do szczepu dzikiego, w obecności pirogronianu, świadczy najprawdopodobniej o występowaniu alternatywnych dróg metabolizowania tego źródła węgla w komórkach *M. smegmatis* oraz złożonych sieciach metabolicznych składających się na proces glikolizy.

Analiza transkryptomiczna ujawniła różnice w ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm fruktozy i mannozy, szlak pentozofosforanowy oraz w proces glikolizy/glukoneogenezy, prowadząc do indukcji genu *msmeg_3947* w szczepie mutancie Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238*) w obecności 2% glukozy w odniesieniu do szczepu dzikiego. Badania przeprowadzone przez Mushtaqa i wsp., wskazują, iż gen Rv2029c, będący ortologiem genu *msmeg_3947* u prątków gruźlicy, pełni funkcję fruktokinazy, która katalizuje zależną od ATP konwersję fruktozy do fruktozo-6-fosforanu (Mushtaq i wsp., 2015). Biorąc pod uwagę doniesienia naukowe i uzyskane przez nas wyniki analiz transkryptomicznych, postanowiono zweryfikować zdolność analizowanych szczepów do metabolizowania fruktozy, stanowiącej jedyne źródło węgla. Przeprowadzona analiza potwierdziła zdolność szczepów do wykorzystania fruktozy w warunkach głodu węglowego. Brak różnic w kinetyce wzrostu szczepu mutanta Δ*(msmeg_6236/msmeg_6238*) w odniesieniu do szczepu kontrolnego, może wskazywać na występowanie alternatywnych

ścieżek metabolizmu fruktozy, które są aktywowane w warunkach głodu węglowego. Uzyskane przez nas dane potwierdzają wnioski, wysunięte przez zespół Baloniego (Baloni i wsp., 2014). Przeprowadzone przez Baloniego i wsp., analizy transkryptomiczne i fenotypowe *M. smegmatis* pozwoliły na zmapowanie szlaków metabolicznych zachodzących w komórkach tych prątków oraz wysunięcie hipotezy o występowaniu różnych, często alternatywnych ścieżek wykorzystania różnych związków, które mogą uaktywniać się w określonych warunkach. Atrakcyjną interpretacją uzyskanych wyników jest również potencjalna rola MnoR jako represora genu fruktokinazy. Indukcja ekspresji fruktokinazy u mutanta MnoSR w obecności 2% glukozy może również wskazywać na bezpośrednią lub pośrednią rolę tego TCS w blokowaniu ekspresji fruktokinazy w obecności glukozy. Brak funkcjonalnego represora MnoR mógłby doprowadzić do uwolnienia ekspresji fruktokinazy. Brak represora u mutanta, nie mógł natomiast wpłynąć na zdolność wykorzystania fruktozy jako jedynego źródła węgla. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji choćby poprzez badanie potencjalnego oddziaływania MnoR z promotorem genu kodującego fruktokinazę.

Bez wątpienia, na uwagę zasługują zmiany odnotowane w poziomie ekspresji genu *msmeg_3272*, zaangażowanego w regulację szlaku pentozofosforanowego w komórkach *M. smegmatis*. Przeprowadzone przez nas analizy wskazują na obniżoną ekspresję genu *msmeg_3272* w szczepie mutancie w odniesieniu do szczepu kontrolnego w warunkach niedoboru węgla, co wskazuje na potencjalną rolę MnoRS w regulacji szlaku pentozofosforanowego. Enzym izomeraza rybozo-5-fosforanowa (Rpi) odpowiadająca za wzajemną konwersję rybozo-5-fosforanu (R5P) i rybulozo-5-fosforanu (Ru5P) jest ważnym enzymem w centralnym metabolizmie węgla u wielu mikroorganizmów m.in. *M. tuberculosis* czy *E. coli*. Związki pośrednie szlaku pentozofosforanowego R5P i Ru5P stanowią substraty wykorzystywane do biosyntezy nukleotydów, aminokwasów aromatycznych czy pirydoksyn (Tang i wsp., 2021).

Przeprowadzona analiza transkryptomiczna wykazała również zmiany w ekspresji genów metabolizmu metanu. W warunkach głodu węglowego zaobserwowaliśmy u mutanta MnoSR wzrost ekspresji genu *msmeg_0159*. Zgodnie z danymi literaturowymi (Zhou i wsp. 2020) poziom ekspresji genu *msmeg_0159* obniża się w warunkach niedoboru składników odżywczych (podłoże LB, 0,5% v/v zawartość glicerolu). Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane przez Zhou, możemy wnioskować, iż zaobserwowany przez nas wzrost

ekspresji genu *msmeg_0159* wynika prawdopodobnie z roli jaką pełni MnoSR w regulacji metabolizmu metanu, w warunkach deficytu źródeł węgla.

Adaptacja do warunków deficytu źródła węgla, niezależna od obecności MnoSR, pociągała za sobą istotne zmiany metaboliczne związane z procesem fosforylacji oksydacyjnej. Mykobakterie wytwarzają energię poprzez fosforylację oksydacyjną, związaną z połączonym działaniem łańcucha transportu elektronów oraz syntezy ATP. Zaobserwowane przez nas zmiany poziomu ekspresji genów tworzących kompleks Nuo są zgodne z wnioskami wysuniętymi przez Liang`a i Rubinstein`a, którzy w swojej pracy wskazują, iż ze względu na silnie rozgałęziony charakter łańcucha transportu elektronów prątków, wykazują one zdolność do zmiany poziomu ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w proces fosforylacji oksydacyjnej w różnych warunkach wzrostu (Liang i Rubinstein, 2023).

Przeprowadzona analiza transkryptomiczna, wykazała wpływ systemu MnoSR na metabolizm argininy, w warunkach niedoboru węgla. Arginina, będąca źródłem węgla i azotu, ma kluczowe znaczenie dla przetrwania *M. tuberculosis* w organizmie gospodarza (Cui i wsp., 2022). Szlak biosyntezy argininy jest regulowany przez osiem enzymów, w tym enzym reduktazę N-acetylo-gamma-glutamylofosforanową, kodowaną przez gen *argC*, który jest niezbędny do wzrostu *M. tuberculosis* w warunkach *in vitro* (Gupta i wsp., 2021). W naszych analizach transkryptomicznych obserwowaliśmy obniżony poziom ekspresji genu *msmeg_3776* u mutanta w warunkach głodu węglowego co może wskazywać na rolę MnoSR w regulacji metabolizmu argininy. Wpływ na regulację metabolizmu argininy zaobserwowano również w przypadku enzymu ureazy, odpowiedzialnej za zjadliwość niektórych bakterii chorobotwórczych, w tym także *M. tuberculosis*. Ureaza odpowiada za katalityczną hydrolizę mocznika do amoniaku i karbaminianu, który szybko hydrolizuje do amoniaku i kwasu węglowego (Isaac i wsp., 2019). Badania przeprowadzone przez Lin`a i wsp., wskazują na udział ureazy w metabolizmie komórek *M. tuberculosis* poprzez dostarczanie źródła azotu, w wyniku hydrolizy mocznika i produkcji amoniaku (Lin i wsp., 2012).

W ramach pracy doktorskiej postanowiono także ocenić potencjalną rolę białka regulatorowego MtrA w metabolizmie azotu u prątków. Analiza kinetyki wzrostu oraz oceny przeżywalności (CFU/ml) szczepu Δ*mtrA* wskazała na znaczenie funkcjonalnego białka MtrA w procesie pozyskiwania azotu z aminokwasów takich jak histydyna, prolina,

metionina, oraz kwasu glutaminowy. Badania dotyczące głównego regulatora metabolizmu azotu u mykobakterii, białka GlnR, przeprowadzone przez Antczak i wsp., (Antczak i wsp., 2018), wykazały kluczową rolę tego czynnika transkrypcyjnego w wykorzystaniu takich źródeł azotu jak kwas moczowy, histydyna, leucyna, allantoina, hydantoina, prolina, glutaminian potasu i acetamid. Przeprowadzone przez nas badania podwójnego mutanta defektywnego w syntezie zarówno GlnR jak i MtrA wykazały niższą przeżywalnością niż mutant Δ*glnR* na podłożu z dodatkiem proliny oraz lepszą przeżywalnością na podłożu z histydyną potwierdzając znaczenie MtrA w zdolności prątków do pozyskiwania azotu z wybranych aminokwasów. O współdziałaniu białek GlnR oraz MtrA w regulacji metabolizmu azotu może świadczyć także podobieństwo ich sekwencji konsensusowych oraz wykazana w ramach niniejszej pracy zdolność do wiązania tej samej sekwencji promotorowej genu *amtB*. Wydaje się, że białko MtrA może wiązać się przynajmniej do części promotorów regulowanych przez GlnR. Wiązanie do tych samych sekwencji promotorowych może być mechanizmem regulującym ekspresję genów w zależności od dostępności określonych źródeł azotu. U *Streptomyces coelicolor* wykazano, że MtrA na podłożu bogatym w związki azotowe wiąże się z promotorem genu *glnR* blokując jego ekspresję (Zhu i wsp., 2019). Przeprowadzone analizy mutantów wzbogacono także o badania ich transkryptomów w warunkach głodzenia azotowego. Analiza danych transkryptomicznych potwierdziła rolę GlnR jako regulatora metabolizmu azotu u mykobakterii a także wskazała na rolę MtrA jako regulatora w metabolizmie argininy, puryn, tyrozyny, jak również szlaków przemian alaniny, asparaginianu i glutaminianu. GlnR, jako główny regulator metabolizmu azotu, wspomagany jest także przez inne białko regulatorowe NarR kontrolujące metabolizm azotanów i azotynów (Antczak i wsp., 2018).

Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wyniki, pozwoliły na poszerzenie naszej wiedzy o roli dwukomponentowego systemu transdukcji sygnału MnoSR w regulacji metabolizmu węgla w warunkach głodu węglowego. Przeprowadzone badania pozwoliły również wykazać, że białko MtrA oprócz znanej roli w regulacji procesu replikacji, podziałów komórkowych oraz syntezy ściany komórkowej prątków (Gorla i wsp., 2018, Purushotham i wsp., 2015) jest również zaangażowane w regulacje metabolizmu azotu.

7. Wnioski

1. Białka MnoS oraz MnoR tworzące dwukomponentowy system transdukcji sygnału u *M. smegmatis* warunkują zdolność prątków do pozyskiwania węgla z alkoholi takich jak 1,3-propandiol, metanol oraz etanol.

2. MnoSR w warunkach głodu węglowego reguluje ekspresję szeregu enzymów zaangażowanych w metabolizm pirogronianu, fruktozy, metanu i innych.

3. Obecność funkcjonalnego białka MtrA warunkuje zdolność prątków do wykorzystania niektórych aminokwasów jako jedynego źródła azotu.

4. Brak funkcjonalnego białka MtrA u mykobakterii w warunkach głodzenia azotowego wpływa na poziom ekspresji enzymów uczestniczących w metabolizmie argininy, puryn, tyrozyny, jak również szlaków przemian alaniny, asparaginianu i glutaminianu.

Streszczenie

Zarówno wewnątrzkomórkowe patogeny *M. tuberculosis* jak i szczepy saprofityczne takie jak *M. smegmatis* muszą posiadać zdolność adaptacji do zmian zachodzących w środowisku wzrostu, takich jak dostępność substancji odżywczych w tym źródeł węgla i azotu, obecność antybiotyków, metali ciężkich czy też elementów układu odpornościowego gospodarza. Do systemów adaptacyjnych, umożliwiających bakteriom dostosowanie się do niekorzystnych warunków zaliczamy m.in. dwukomponentowe systemy transdukcji sygnału (TCSs), które są zaangażowane w wiele procesów metabolicznych w tym w regulację szlaków katabolicznych, wykształcenie mechanizmów wirulencji czy transport substancji odżywczych.

Liczba TCSs występujących u bakterii jest zróżnicowana. Analiza genomów różnych gatunków bakterii wykazała, iż mikroorganizmy te mają średnio 52 TCSs. Większość TCSs zawiera dwa podstawowe komponenty: białko sensorowe tj. kinazę histydynową (HK) oraz jego docelowe białko regulatorowe (RR) czyli regulator odpowiedzi.

Systemem występującym w komórkach prątków *M. smegmatis*, nie mającym swojego odpowiednika u prątków gruźlicy, jest dwukomponentowy system transdukcji sygnału MnoSR, w skład którego wchodzi kinaza histydynowa MnoS (MSMEG_6238) oraz regulator odpowiedzi MnoR (MSMEG_6236). Geny kodujące system MnoSR tworzą wspólny operon (*mnoSR*) a ich produkty biorą udział w regulacji metabolizmu metylotroficznego u *M. smegmatis*. Wykonane w ramach pracy doktorskiej analizy miały pomóc w określeniu funkcji białek MnoS i MnoR, wchodzących w skład systemu MnoSR w metabolizmie prątków. W tym celu, przy zastosowaniu homologicznej rekombinacji, skonstruowano ukierunkowane, nieoznaczone mutanty *M. smegmatis* pozbawione genu *msmeg_6236, msmeg_623* lub obu genów równocześnie. Uzyskane mutanty komplementowano także funkcjonalną kopią genów w celu uzyskania szczepów kontrolnych. Rekombinowane szczepy poddano następnie analizie wzrostu na podłożach minimalnych zawierających zdefiniowane źródła węgla i azotu. Analiza kinetyki wzrostu wykazała, że inaktywacja systemu MnoSR upośledza zdolność *M. smegmatis* do wykorzystania alkoholi takich jak 1,3-propandiol, metanol i etanol jako źródła węgla, nie wpływa natomiast na zdolność wykorzystania większości mono- i disacharydów z wyjątkiem fruktozy. Nie zaobserwowano natomiast upośledzenia wzrostu

rekombinowanych szczepów na podłożu minimalnym z szeregiem organicznych i nieorganicznych źródeł azotu. Inaktywacja systemu MnoSR nie wpłynęła także na zmianę wrażliwości *M. smegmatis* na antybiotyki aminoglikozydowe, tetracykliny, etambutol oraz rifampicynę. W celu poznania znaczenia systemu MnoSR w globalne odpowiedzi prątków na limitowany dostęp węgla zastosowano metodę sekwencjonowania całkowitego RNA (RNASeq) szczepu kontrolnego oraz mutanta Δ(*mtrA*/*glnR*) rosnących na podłożu minimalnym z dodatkiem 2% glukozy, 0,1% glukozy (głodzenie) oraz 0,1% glukozy i 2% 1,3-propandiolu. Przeprowadzone analizy transkryptomiczne pozwoliły na poznanie globalnej odpowiedzi prątków na głodzenie węglowe, a także na bezpośrednią bądź pośrednią, rolę MnoSR w metabolizmie *M. smegmatis* w warunkach dostępu (2%) bądź braku (0,1%) glukozy jako jedynego źródła węgla. Uzyskane dane transkryptomiczne wskazały na znaczącą rolę MnoSR w metabolizmie pirogronianu pełniącego rolę substratu energetycznego a także stanowiącego źródło prekursorów dla licznych procesów biosyntetycznych takich jak synteza aminokwasów, puryn, pirymidyn czy glukozy. Ponadto zaobserwowano istotne zmiany w ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm fruktozy, metanu oraz uczestniczące w szlaku pentozofosforanowym u szczepu pozbawionego funkcjonalnego systemu MnoSR.

Celem drugiej części badań było poznanie roli regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotu u mykobakterii. Ze względu na wysokie podobieństwo sekwencji konsensusowych dla podstawowego regulatora przemian azotowych u mykobakterii białka GlnR oraz białka MtrA, postawiono hipotezę, że białka te mogą wiązać te same sekwencje regulatorowe i współuczestniczyć w regulacji genów, których produkty warunkują transport lub utylizację źródeł azotu. W przeprowadzonych badaniach in vitro wykazano, że białka MtrA oraz GlnR wiążą się do sekwencji promotorowej genu *amtB* kodującego białko uczestniczące w transporcie amonu. Konstrukcja podwójnego mutanta, pozbawionego obu badanych białek regulatorowych oraz analiza zdolności do wzrostu szczepów Δ*mtrA* oraz Δ(*mtrA/glnR*) na podłożu minimalnym zawierającym zdefiniowane źródła azotu wykazały, że brak regulatora MtrA upośledza zdolność prątków do wykorzystania organicznych źródeł azotu w postaci niektórych aminokwasów (histydyna, prolina, metionina, kwas glutaminowy). W celu poznania globalnej odpowiedzi badanych mutantów na deficyt dostępnego w podłożu azotu przeprowadzono badania transkryptomiczne szczepu kontrolnego oraz mutantów Δ*mtrA* oraz Δ(*mtrA/glnR*) rosnących na podłożu minimalnym zawierającym siarczan amonu w stężeniu 1 mM. Analiza

danych transkryptomicznych pozwoliła zaobserwować zmianę ekspresji genów, których produkty są zaangażowane w przemiany azotowe w szczepach pozbawionych funkcjonalnego białka regulatorowego MtrA. Największe zmiany w ekspresji genów w mutancie Δ*mtrA* zaobserwowano dla enzymów zaangażowanych w metabolizm argininy, puryn, tyrozyny, jak również szlaków przemian alaniny, asparaginianu i glutaminianu.

Przeprowadzone badania pozwoliły na lepsze zrozumienie roli systemu MnoSR w regulacji metabolizmu węglowego u prątków oraz regulatora odpowiedzi MtrA w regulacji metabolizmu azotowego.

Summary

Both intracellular pathogen *M. tuberculosis* and saprophytic strain *M. smegmatis* must be able to adapt to changes in the growth environment, such as the availability of nutrients, including carbon and nitrogen sources, the presence of antibiotics, heavy metals or elements of the host's immune system. Adaptive systems that allow bacteria to adapt to unfavorable conditions include, among others, two-component signal transduction systems (TCSs), which are involved in many metabolic processes, including the regulation of catabolic pathways, the development of virulence mechanisms or the transport of nutrients.

The number of TCSs found in bacteria varies. Analysis of the genomes of different species of bacteria showed that these microorganisms have an average of 52 TCSs. Most TCSs contain two basic components: the sensor protein, i.e. histidine kinase (HK) and its target regulatory protein (RR), i.e. the response regulator.

The system presents in *M. smegmatis* cells, having no equivalent in mycobacterium tuberculosis, is the two-component MnoSR signal transduction system, which includes the MnoS histidine kinase (MSMEG_6238) and the MnoR response regulator (MSMEG_6236). The genes encoding the MnoSR system form a common operon (mnoSR) and their products are involved in the regulation of methylotrophic metabolism in *M. smegmatis*. The analyzes performed as part of the doctoral thesis were to help determine the function of the MnoS and MnoR proteins, which are part of the MnoSR system, in the metabolism of mycobacteria. For this purpose, targeted, unmarked *M. smegmatis* mutants lacking *msmeg_6236*, *msmeg_6238* or both genes were constructed using homologous recombination. The resulting mutants were also complemented with a functional copy of the genes to obtain control strains. The recombinant strains were then analyzed for growth on minimal media containing defined carbon and nitrogen sources. Growth kinetics analysis showed that inactivation of the MnoSR system impairs the ability of *M. smegmatis* to use alcohols such as 1,3-propanediol, methanol and ethanol as a carbon source, but does not affect the ability to use most mono- and disaccharides except fructose. However, no impairment of growth of recombinant strains was observed on minimal medium with a range of organic and inorganic nitrogen sources. Inactivation of the MnoSR system also did not change the susceptibility of *M. smegmatis* to aminoglycoside antibiotics, tetracyclines, ethambutol and

rifampicin. In order to understand the importance of the MnoSR system in the global responses of mycobacteria to limited carbon access, the total RNA sequencing method (RNASeq) of the control strain and the Δ(*mtrA*/*glnR*) mutant grown on a minimal medium with the addition of 2% glucose, 0.1% glucose (starvation) was used. and 0.1% glucose and 2% 1.3-propanediol. The performed transcriptomic analyzes revealed the global response of mycobacteria to carbon starvation, as well as the direct or indirect role of MnoSR in the metabolism of *M. smegmatis* in the conditions of access (2%) or absence (0.1%) of glucose as the only carbon source. The obtained transcriptomic data indicated a significant role of MnoSR in the metabolism of pyruvate, which acts as an energy substrate and is also a source of precursors for numerous biosynthetic processes, such as the synthesis of amino acids, purines, pyrimidines or glucose. In addition, significant changes were observed in the expression of genes encoding enzymes involved in the metabolism of fructose, methane and participating in the pentose phosphate pathway in a strain lacking a functional MnoSR system.

The aim of the second part of the study was to investigate the role of the MtrA response regulator in the regulation of nitrogen metabolism in mycobacteria. Due to the high similarity of the consensus sequences for the basic regulator of nitrogen metabolism in mycobacteria, the GlnR protein and the MtrA protein, it was hypothesized that these proteins may bind the same regulatory sequences and participate in the regulation of genes whose products determine the transport or utilization of nitrogen sources. In vitro studies have shown that the MtrA and GlnR proteins bind to the promoter sequence of the amtB gene encoding a protein involved in ammonium transport. The construction of a double mutant devoid of both tested regulatory proteins and the analysis of the ability to grow ΔmtrA and Δ(mtrA/glnR) strains on a minimal medium containing defined nitrogen sources showed that the lack of the MtrA regulator impairs the ability of mycobacteria to use organic nitrogen sources in the form of certain amino acids (histidine , proline, methionine, glutamic acid). In order to determine the global response of the tested mutants to the deficit of nitrogen available in the medium, transcriptomic studies of the control strain and the ΔmtrA and Δ(mtrA/glnR) mutants growing on a minimal medium containing ammonium sulfate at a concentration of 1 mM were carried out. Analysis of transcriptomic data item preferred to observe a change in the expression of genes whose products are involved in nitrogen transformations in strains lacking a functional MtrA regulatory protein. The greatest changes in gene expression in the Δ*mtrA* mutant were observed for enzymes

involved in the metabolism of arginine, purines, tyrosine, as well as alanine, aspartate and glutamate pathways.

The conducted research allowed for a better understanding of the role of the MnoSR system in the regulation of carbon metabolism in mycobacteria and the MtrA response regulator in the regulation of nitrogen metabolism.

Bibliografia

1 Agapova A., Serafini A., Petridis M., Hunt D.M., Garza-Garcia A., Sohaskey C.D., de Carvalho L.P.S., 2019, **Flexible nitrogen utilisation by the metabolic generalist pathogen *Mycobacterium tuberculosis***. Elife. Jan 31; 8:e41129.

2 Agrawal R., Pandey A., Rajankar M.P., Dixit N.M., Saini D.K., 2015, **The two-component signalling networks of *Mycobacterium tuberculosis* display extensive cross-talk in vitro**. Biochem J. Jul 1; 469(1):121-34.

3 Alderwick L.J., Harrison J., Lloyd G.S., Birch H.L., 2015, **The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan**. Cold Spring Harb Perspect Med. Mar 27; 5(8).

4 Ali M.K., Li X., Tang Q., Liu X., Chen F., Xiao J., Ali M., Chou S.H., He J., 2017, **Regulation of Inducible Potassium Transporter KdpFABC by the KdpD/KdpE Two-Component System in *Mycobacterium smegmatis***. Front Microbiol. Apr 24; 8:570.

5 Alvarez A.F., Georgellis D., 2022, **The role of sensory kinase proteins in two-component signal transduction**. Biochem Soc Trans. Dec 16; 50(6):1859-1873.

6 Antczak M., Płocińska R., Płociński P., Rumijowska-Galewicz A., Żaczek A., Strapagiel D., Dziadek J., 2018, **The NnaR orphan response regulator is essential for the utilization of nitrate and nitrite as sole nitrogen sources in mycobacteria**. Sci Rep. Dec 3; 8(1):17552.

7 Aravind L., Ponting C.P., 1999, **The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins**. FEMS Microbiol Lett. Jul 1; 176(1):111-6.

8 Bachmann N.L., Salamzade R., Manson A.L., Whittington R., Sintchenko V., Earl A.M., Marais B.J., 2020, **Key Transitions in the Evolution of Rapid and Slow Growing *Mycobacteria* Identified by Comparative Genomics**. Front Microbiol. Jan 21; 10:3019.

9 Baloni P., Padiadpu J., Singh A., Gupta K.R., Chandra N., 2014, **Identifying feasible metabolic routes in *Mycobacterium smegmatis* and possible alterations under diverse nutrient conditions**. BMC Microbiol. Nov 18; 14:276.

10 Bansal R., Anil Kumar V., Sevalkar R.R., Singh P.R., Sarkar D., 2017, ***Mycobacterium tuberculosis* virulence-regulator PhoP interacts with alternative sigma factor SigE during acid-stress response**. Mol Microbiol. May; 104(3):400-411.

11 Bañuls A.L., Sanou A., Van Anh N.T., Godreuil S., 2015, ***Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium**. J Med Microbiol. Nov; 64(11):1261-1269.

12 Bhandari A., Mahajan R., Ramesh V., 2022, **Drug-resistance and its impact on cutaneous tuberculosis.** Indian Dermatol Online J. Sep 5; 13(5):570-577.

13 Bian X., Jiang H., Meng Y., Li Y.P., Fang J., Lu Z., 2022, **Regulation of gene expression by glycolytic and gluconeogenic enzymes**. Trends Cell Biol. Sep; 32(9):786-799.

14 Billane K., Harrison E., Cameron D., Brockhurst M.A., 2022, **Why do plasmids manipulate the expression of bacterial phenotypes?** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Jan 17; 377(1842):20200461.

15 Bilwes A.M., Alex L.A., Crane B.R., Simon M.I., 1999, **Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase**. Cell. Jan 8; 96(1):131-41.

16 Bleul L., Francois P., Wolz C., 2021, **Two-Component Systems of *S. aureus*: Signaling and Sensing Mechanisms**. Genes (Basel). Dec 23; 13(1):34.

17 Bonds A.C., Sampson N.S., 2018, **More than cholesterol catabolism: regulatory vulnerabilities in *Mycobacterium tuberculosis***. Curr Opin Chem Biol. Jun; 44:39-46.

18 Borah K., Beyß M., Theorell A., Wu H., Basu P., Mendum T.A., Nöh K., Beste D.J.V., McFadden J., 2019, **Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* Exploits Multiple Host Nitrogen Sources during Growth in Human Macrophages**. Cell Rep. Dec 10; 29(11):3580-3591.e4.

19 Borah K., Mendum T.A., Hawkins N.D., Ward J.L., Beale M.H., Larrouy-Maumus G., Bhatt A., Moulin M., Haertlein M., Strohmeier G., Pichler H., Forsyth V.T., Noack S., Goulding C.W., McFadden J., Beste D.J.V., 2021, **Metabolic fluxes for nutritional flexibility of *Mycobacterium tuberculosis***. Mol Syst Biol. May; 17(5):e10280.

20 Borah Slater K., Kim D., Chand P., Xu Y., Shaikh H., Undale V., 2023, **A Current Perspective on the Potential of Nanomedicine for Anti-Tuberculosis Therapy**. Trop Med Infect Dis. Feb 3; 8(2):100.

21 Bretl D.J., Bigley T.M., Terhune S.S., Zahrt T.C., 2014, **The MprB extracytoplasmic domain negatively regulates activation of the *Mycobacterium tuberculosis* MprAB two-component system**. J Bacteriol. Jan; 196(2):391-406.

22 Bretl D.J., Demetriadou C., Zahrt T.C., 2011, **Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis***. Microbiol Mol Biol Rev. Dec; 75(4):566-82.

23 Bretl D.J., Demetriadou C., Zahrt T.C., 2011, **Adaptation to environmental stimuli within the host: two-component signal transduction systems of *Mycobacterium tuberculosis***. Microbiol Mol Biol Rev. Dec; 75(4):566-82.

24 Busby S.J.W., 2019, **Transcription activation in bacteria: ancient and modern**. Microbiology (Reading). Apr; 165(4):386-395.

25 Bussi C., Gutierrez M.G., 2019, ***Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time**. FEMS Microbiol Rev. Jul 1; 43(4):341-361.

26 Butcher R.J., Tabor J.J., 2022, **Real-time detection of response regulator phosphorylation dynamics in live bacteria**. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 30; 119(35):e2201204119.

27 Cabezudo I., Lobertti C.A., Véscovi E.G., Furlan R.L.E., 2022, **Effect-Directed Synthesis of PhoP/PhoQ Inhibitors to Regulate *Salmonella* Virulence**. J Agric Food Chem. Jun 8; 70(22):6755-6763.

28 Casella L.G., Torres N.J., Tomlinson B.R., Shepherd M., Shaw L.N., 2023, ***The novel two-component system AmsSR governs alternative metabolic pathway usage in Acinetobacter baumannii***. Front Microbiol. Apr 4; 14:1139253.

29 Cerqueira G.M., Kostoulias X., Khoo C., Aibinu I., Qu Y., Traven A., Peleg A.Y., 2014, **A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway**. J Infect Dis. Jul 1; 210(1):46-55.

30 Chakaya J., Petersen E., Nantanda R., Mungai B.N., Migliori G.B., Amanullah F., Lungu P., Ntoumi F., Kumarasamy N., Maeurer M., Zumla A., 2022, **The WHO Global Tuberculosis 2021 Report - not so good news and turning the tide back to End TB**. Int J Infect Dis. Nov; 124 Suppl 1:S26-S29.

31 Chatterjee A., Sharma A.K., Mahatha A.C., Banerjee S.K., Kumar M., Saha S., Basu J., Kundu M., 2018, **Global mapping of MtrA-binding sites links MtrA to regulation of its targets in *Mycobacterium tuberculosis***. Microbiology (Reading). Jan; 164(1):99-110.

32 Chavarro-Portillo B., Soto C.Y., Guerrero M.I., 2019, **Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation**. Acta Trop. Sep; 197:105041.

33 Chen J., Boyaci H., Campbell E.A., 2021, **Diverse and unified mechanisms of transcription initiation in bacteria**. Nat Rev Microbiol. Feb; 19(2):95-109.

34 Cock P.J., Whitworth D.E., 2007, **Evolution of prokaryotic two-component system signaling pathways: gene fusions and fissions**. Mol Biol Evol. Nov; 24(11):2355-7.

35 Cordova L.T., Alper H.S., 2016, **Central metabolic nodes for diverse biochemical production**. Curr Opin Chem Biol.; 35:37-42.

36 Cui Y., Dang G., Wang H., Tang Y., Lv M., Zang X., Cai Z., Cui Z., Cao J., Liu S,, Song N., 2022, **DosR Regulates the Transcription of the Arginine Biosynthesis Gene Cluster by Binding to the Regulatory Sequences in *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin**. DNA Cell Biol. Dec; 41(12):1063-1074.

37 Cumming B.M., Steyn A.J., 2015, **Metabolic plasticity of central carbon metabolism protects mycobacteria**. Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 27; 112(43):13135-6.

38 Dadura K,. Płocińska R., Rumijowska-Galewicz A., Płociński P., Żaczek A., Dziadek B., Zaborowski A., Dziadek J., 2017, **PdtaS Deficiency Affects Resistance of Mycobacteria to Ribosome Targeting Antibiotics**. Front Microbiol. Nov 3; 8:2145.

39 Dahl J.L., Gatlin Iii W., Tran P.M., Sheik C.S., 2019, ***Mycolicibacterium nivoides* sp. nov isolated from a peat bog**. Int J Syst Evol Microbiol. Jun; 71(3):004438.

40 Danelishvili L., Everman J.L., McNamara M.J., Bermudez L.E., 2012, **Inhibition of the Plasma-Membrane-Associated Serine Protease Cathepsin G by**

***Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c Suppresses Caspase-1 and Pyroptosis in Macrophages**. Front Microbiol. Jan 11; 2:281.

41 Dechow S.J., Goyal R., Johnson B.K., Abramovitch R.B., 2022, **Carbon dioxide regulates *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR signaling and virulence**. bioRxiv; 04.12.488064.

42 Dong W., Wang R., Li P., Wang G., Ren X., Feng J., Lu H., Lu W., Wang X., Chen H., Tan C., 2020, **Orphan response regulator Rv3143 increases antibiotic sensitivity by regulating cell wall permeability in *Mycobacterium smegmatis***. Arch Biochem Biophys. Oct 15; 692:108522.

43 Dubey A.A., Jain V., 2019, **MnoSR Is a Bona Fide Two-Component System Involved in Methylotrophic Metabolism in *Mycobacterium smegmatis***. Appl Environ Microbiol. Jun 17; 85(13):e00535-19.

44 Eoh H., Rhee K.Y., 2014, **Methylcitrate cycle defines the bactericidal essentiality of isocitrate lyase for survival of *Mycobacterium tuberculosis* on fatty acids**. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 1; 111(13):4976-81.

45 Fang H., Yu D., Hong Y., Zhou X., Li C., Sun B., 2013, **The LuxR family regulator Rv0195 modulates *Mycobacterium tuberculosis* dormancy and virulence**. Tuberculosis (Edinb). Jul; 93(4):425-31.

46 Fehily S.R., Al-Ani A.H., Abdelmalak J., Rentch C., Zhang E., Denholm J.T., Johnson D., Ng S.C., Sharma V., Rubin D.T., Gibson P.R., Christensen B., 2022, **Review article: latent tuberculosis in patients with inflammatory bowel diseases receiving immunosuppression-risks, screening, diagnosis and management**. Aliment Pharmacol Ther. Jul; 56(1):6-27.

47 Feng L., Chen S., Hu Y., 2018, **PhoPR Positively Regulates *whiB3* Expression in Response to Low pH in Pathogenic Mycobacteria**. J Bacteriol. Mar 26; 200(8):e00766-17.

48 Fol M., Chauhan A., Nair N.K., Maloney E., Moomey M., Jagannath C., Madiraju M.V., Rajagopalan M., 2006, **Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* proliferation by MtrA, an essential two-component response regulator**. Mol Microbiol. May; 60(3):643-57.

49 Forbes B.A., 2017, **Mycobacterial Taxonomy**. J Clin Microbiol. Feb; 55(2):380-383.

50 Friedland N., Mack T.R., Yu M., Hung L.W., Terwilliger T.C., Waldo G.S., Stock A.M., 2007, **Domain orientation in the inactive response regulator *Mycobacterium tuberculosis* MtrA provides a barrier to activation**. Biochemistry. Jun 12; 46(23):6733-43.

51 Gautam U.S., Mehra S., Kumari P., Alvarez X., Niu T., Tyagi J.S., Kaushal D., 2019, ***Mycobacterium tuberculosis* sensor kinase DosS modulates the autophagosome in a DosR-independent manner**. Commun Biol. Sep 20; 2:349.

52 Geneva: World Health organization., 2022, **Global tuberculosis report 2022**. licence: cc bY-Nc-sa 3.0 iGo.

53 Getahun H., Chaisson R.E., Raviglione M., 2015, **Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection.** N Engl J Med. Sep 17; 373(12):1179-80.

54 Ghilarov D., Inaba-Inoue S., Stepien P., Qu F., Michalczyk E., Pakosz Z., Nomura N., Ogasawara S., Walker G.C., Rebuffat S., Iwata S., Heddle J.G., Beis K., 2021, **Molecular mechanism of SbmA, a promiscuous transporter exploited by antimicrobial peptides**. Sci Adv. Sep 10; 7(37):eabj5363.

55 Giacalone D., Yap R.E., Ecker A.M.V., Tan S., 2022, **PrrA modulates *Mycobacterium tuberculosis* response to multiple environmental cues and is critically regulated by serine/threonine protein kinases**. PLoS Genet. Aug 1; 18(8):e1010331.

56 Gorla P., Plocinska R., Sarva K., Satsangi A.T., Pandeeti E., Donnelly R., Dziadek J., Rajagopalan M., Madiraju M.V., 2018, **MtrA Response Regulator Controls Cell Division and Cell Wall Metabolism and Affects Susceptibility of Mycobacteria to the First Line Antituberculosis Drugs**. Front Microbiol. Nov 23; 9:2839.

57 Gorla P., Plocinska R., Sarva K., Satsangi A.T., Pandeeti E., Donnelly R., Dziadek J., Rajagopalan M., Madiraju M.V., 2018, **MtrA Response Regulator Controls Cell Division and Cell Wall Metabolism and Affects Susceptibility of Mycobacteria to the First Line Antituberculosis Drugs**. Front Microbiol. Nov 23; 9:2839.

58 Groisman E.A., 2016, **Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems**. Annu Rev Microbiol. Sep 8; 70:103-24.

59 Groisman E.A., 2016, **Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems**. Annu Rev Microbiol. Sep 8; 70:103-24.

60 Gu H., Cai X., Zhang X., Luo J., Zhang X., Hu X., Cai W., Li G., 2021, **A previously uncharacterized two-component signaling system in uropathogenic *Escherichia coli* coordinates protection against host-derived oxidative stress with activation of hemolysin-mediated host cell pyroptosis**. PLoS Pathog. Oct 15; 17(10):e1010005.

61 Gupta P., Thomas S.E., Zaidan S.A., Pasillas M.A., Cory-Wright J., Sebastián-Pérez V., Burgess A., Cattermole E., Meghir C., Abell C., Coyne A.G., Jacobs W.R. Jr., Blundell T.L., Tiwari S., Mendes V., 2021, **A fragment-based approach to assess the ligandability of ArgB, ArgC, ArgD and ArgF in the L-arginine biosynthetic pathway of *Mycobacterium tuberculosis***. Comput Struct Biotechnol J. Jun 4; 19:3491-3506.

62 Gupta R.S., Lo B., Son J., 2018, **Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera**. Feb 13;9:67/Erratum in: Front Microbiol. 2019 Apr 09; 10:714.

63 Hamidieh F., Farnia P., Nowroozi J., Farnia P., Velayati A.A., 2021, **An Overview of Genetic Information of Latent *Mycobacterium tuberculosis***. Tuberc Respir Dis (Seoul). an; 84(1):1-12.

64 Han Y., Li C., Yan Y., Lin M., Ke X., Zhang Y., Zhan Y., 2022, **Post-transcriptional control of bacterial nitrogen metabolism by regulatory noncoding RNAs**. World J Microbiol Biotechnol. Jun 6; 38(7):126.

65 Hariharan V.N., Yadav R., Thakur C., Singh A., Gopinathan R., Singh D.P., Sankhe G., Malhotra V., Chandra N., Bhatt A., Saini D.K., 2021, **Cyclic di-GMP sensing histidine kinase PdtaS controls mycobacterial adaptation to carbon sources**. FASEB J. Apr; 35(4):e21475.

66 Haydel S.E., Clark-Curtiss J.E., 2006, **The *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator represses transcription of the intracellularly expressed Rv1057 gene, encoding a seven-bladed beta-propeller**. J Bacteriol. Jan; 188(1):150-9.

67 Hegde S.R., 2020, **Computational Identification of the Proteins Associated With Quorum Sensing and Biofilm Formation in *Mycobacterium tuberculosis***. Front Microbiol. Jan 22; 10:3011.

68 Hirakawa H., Kurushima J., Hashimoto Y., Tomita H., 2020, **Progress Overview of Bacterial Two-Component Regulatory Systems as Potential Targets for Antimicrobial Chemotherapy**. Antibiotics (Basel). Sep 23; 9(10):635.

69 Ibrahim I.M., Puthiyaveetil S., Allen J.F., 2016, **A Two-Component Regulatory System in Transcriptional Control of Photosystem Stoichiometry: Redox-Dependent and Sodium Ion-Dependent Phosphoryl Transfer from Cyanobacterial Histidine Kinase Hik2 to Response Regulators Rre1 and RppA**. Front Plant Sci. Feb 12; 7:137.

70 Isaac I.O., Al-Rashida M., Rahman S.U., Alharthy R.D., Asari A., Hameed A., Khan K.M., Iqbal J., 2019, **Acridine-based (thio)semicarbazones and hydrazones: Synthesis, in vitro urease inhibition, molecular docking and in-silico ADME evaluation**. Bioorg Chem. Feb; 82:6-16.

71 Jaworska K., Staniszewska W., Gomza P., Rożen P., Brzostek K. Raczkowska A., 2022, **Oddziaływania Pomiędzy Małymi, Regulatorowymi RNA a Dwuskładnikowymi Systemami Transdukcji Sygnału u Bakterii Gram-Ujemnych.** Postępy Mikrobiologii – (Advancements of Microbiology), vol.61, no.4; pp.191-204.

72 Jenkins V.A., Barton G.R., Robertson B.D., Williams K.J., 2013, **Genome wide analysis of the complete GlnR nitrogen-response regulon in *Mycobacterium smegmatis***. BMC Genomics. May 4; 14:301.

73 Jenkins V.A., Barton G.R., Robertson B.D., Williams K.J., 2013, **Genome wide analysis of the complete GlnR nitrogen-response regulon in *Mycobacterium smegmatis***. BMC Genomics. May 4; 14:301.

74 Jeßberger N., Lu Y., Amon J., Titgemeyer F., Sonnewald S., Reid S., Burkovski A.., 2013, **Nitrogen starvation-induced transcriptome alterations and influence of transcription regulator mutants in Mycobacterium smegmatis**. BMC Res Notes. Nov 22; 6:482.

75 Kalia N.P., Shi Lee B., Ab Rahman N.B., Moraski G.C., Miller M.J., Pethe K., 2019, **Carbon metabolism modulates the efficacy of drugs targeting the cytochrome bc_1:aa_3 in *Mycobacterium tuberculosis***. Sci Rep.Jun 13; 9(1):8608.

76 Kalscheuer R., Palacios A., Anso I., Cifuente J., Anguita J., Jacobs W.R. Jr., Guerin M.E., Prados-Rosales R., 2019, **The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: a cell structure with key implications in pathogenesis**. Biochem J. Jul 18; 476(14):1995-2016.

77 Kanabalan R.D., Lee L.J., Lee T.Y., Chong P.P., Hassan L., Ismail R., Chin V.K., 2021, **Human tuberculosis and Mycobacterium tuberculosis complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery**. Microbiol Res. 246; 126674.

78 Kestler B., Tyler S.K., 2022, **Latent tuberculosis testing through the ages: the search for a sleeping killer**. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Mar 1; 322(3):L412-L419.

79 Khan F., Jeong G.J., Tabassum N., Mishra A., Kim Y.M., 2022, **Filamentous morphology of bacterial pathogens: regulatory factors and control strategies**. Appl Microbiol Biotechnol. Sep; 106(18):5835-5862.

80 Kim C.J., Kim N.H., Song K.H., Choe P.G., Kim E.S., Park S.W., Kim H.B., Kim N.J., Kim E.C., Park W.B., Oh M.D., 2013, **Differentiating rapid- and slow-growing mycobacteria by difference in time to growth detection in liquid media**. Diagn Microbiol Infect Dis. Jan; 75(1):73-6.

81 Kinoshita-Kikuta E., Koike T., Kinoshita E., 2022, **Recent advances in the Phos-tag technique focused on the analysis of phosphoproteins in a bacterial two-component system**. J Proteomics. Feb 10; 252:104429.

82 Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J., 2008, **Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death**. Cell. Nov 14; 135(4):679-90.

83 Krell T., Lacal J., Busch A., Silva-Jiménez H., Guazzaroni M.E., Ramos J.L., 2010, **Bacterial sensor kinases: diversity in the recognition of environmental signals**. Annu Rev Microbiol. 64:539-59.

84 Kundu M., 2018, **The role of two-component systems in the physiology of *Mycobacterium tuberculosis***. IUBMB Life. Aug; 70(8):710-717.

85 Lagautriere T., Bashiri G., Paterson N.G., Berney M., Cook G.M., Baker E.N., 2014, **Characterization of the proline-utilization pathway in *Mycobacterium tuberculosis* through structural and functional studies**. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. Apr; 70(Pt 4):968-80.

86 Lai X., Stigliani A., Vachon G., Carles C., Smaczniak C., Zubieta C., Kaufmann K., Parcy F., 2019, **Building Transcription Factor Binding Site Models to Understand Gene Regulation in Plants**. Mol Plant. Jun 3; 12(6):743-763.

87 Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods. 2012 Mar 4;9(4):357-9.

88 Li G., Morigen, Yao Y., 2022, **TorR/TorS Two-Component system resists extreme acid environment by regulating the key response factor RpoS in *Escherichia coli***. Gene. May 5; 821:146295.

89 Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 2009, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools**. Bioinformatics. Aug 15; 25(16):2078-9.

90 Liang Y., Rubinstein J.L., 2023, **Structural analysis of mycobacterial electron transport chain complexes by cryoEM**. Biochem Soc Trans. Feb 27; 51(1):183-193.

91 Lin W., Mathys V., Ang E.L., Koh V.H., Martínez Gómez J.M., Ang M.L., Zainul Rahim S.Z., Tan M.P., Pethe K., Alonso S., 2012, **Urease activity represents an alternative pathway for *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen metabolism**. Infect Immun. Aug; 80(8):2771-9.

92 Liu C., Sun D., Zhu J., Liu W., 2019, **Two-Component Signal Transduction Systems: A Major Strategy for Connecting Input Stimuli to Biofilm Formation**. Front Microbiol. Jan 10; 9:3279.

93 Ma H., Liu W.B., Zhang X.P., Hu H.Q., Gu S.D., Yuan H., Ye B.C., 2022, **GlnR-mediated regulation of KstR controls cholesterol catabolism in *Mycobacterium smegmatis***. Biotechnol Appl Biochem. Jun; 69(3):1209-1216.

94 Mahatha A.C., Banerjee S.K., Ghosh A., Lata S., Saha S., Basu J., Kundu M., 2022, **A systems approach to decipher a role of transcription factor RegX3 in the adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to hypoxic stress**. Microbiology (Reading). Aug; 168(8).

95 Maison D.P., 2022, **Tuberculosis pathophysiology and anti-VEGF intervention**. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. Jan 19; 27:100300.

96 Malhotra V., Agrawal R., Duncan T.R., Saini D.K., Clark-Curtiss J.E., 2015, ***Mycobacterium tuberculosis* response regulators, DevR and NarL, interact in vivo and co-regulate gene expression during aerobic nitrate metabolism**. J Biol Chem. Mar 27; 290(13):8294-309.

97 Malhotra V., Okon B.P., Satsangi A.T., Das S., Waturuocha U.W., Vashist A., Clark-Curtiss J.E., Saini D.K., 2022, ***Mycobacterium tuberculosis* PknK Substrate Profiling Reveals Essential Transcription Terminator Protein Rho and Two-Component Response Regulators PrrA and MtrA as Novel Targets for Phosphorylation**. Microbiol Spectr. Apr 27; 10(2):e0135421.

98 Marchler-Bauer A., Derbyshire M.K., Gonzales N.R., Lu S., Chitsaz F., Geer L.Y., Geer R.C., He J., Gwadz M., Hurwitz D.I., Lanczycki C.J., Lu F., Marchler G.H., Song J.S., Thanki N., Wang Z., Yamashita R.A., Zhang D., Zheng C., Bryant S.H., 2015, **CDD: NCBI's conserved domain database**. Nucleic Acids Res. Jan; 43(Database issue):D222-6.

99 Martín J.F., Liras P., Sánchez S., 2021, **Modulation of Gene Expression in Actinobacteria by Translational Modification of Transcriptional Factors and Secondary Metabolite Biosynthetic Enzymes**. Front Microbiol. Mar 16; 12:630694.

100 Martin M., 2011, **Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads**. *EMBnet.journal, 17*(1), pp. 10-12.

101 Maslova O., Mindlin S., Beletsky A., Mardanov A., Petrova M., 2022, **Plasmids as Key Players in *Acinetobacter* Adaptation**. Int J Mol Sci. Sep 17; 23(18):10893.

102 McCormick N.E., Jakeman D.L., 2015, **On the mechanism of phosphoenolpyruvate synthetase (PEPs) and its inhibition by sodium fluoride: potential magnesium and aluminum fluoride complexes of phosphoryl transfer**. Biochem Cell Biol. Jun; 93(3):236-40.

103 Meehan C.J., Barco R.A., Loh Y.E., Cogneau S., Rigouts L., 2021, **Reconstituting the genus *Mycobacterium***. Int J Syst Evol Microbiol. Sep; 71(9):004922.

104 Miotto P., Sorrentino R., De Giorgi S., Provvedi R., Cirillo D.M., Manganelli R., 2022, **Transcriptional regulation and drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. Front Cell Infect Microbiol. Sep 2; 12:990312.

105 Morawska L.P., Hernandez-Valdes J.A., Kuipers O.P., 2022, **Diversity of bet-hedging strategies in microbial communities-Recent cases and insights**. WIREs Mech Dis. Mar; 14(2):e1544.

106 Müller-Santos M., Koskimäki J.J., Alves L.P.S., de Souza E.M., Jendrossek D., Pirttilä A.M., 2021, **The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria**. FEMS Microbiol Rev. May 5; 45(3):fuaa058.

107 Mushtaq K., Sheikh J.A., Amir M., Khan N., Singh B., Agrewala J.N., 2015, **Rv2031c of *Mycobacterium tuberculosis*: a master regulator of Rv2028-Rv2031 (HspX) operon**. Front Microbiol. Apr 27; 6:351.

108 Opęchowska M., Bielecki S., 2014, **Rola alternatywnych czynników sigma S (σS) i sigma B (σB) w odpowiedzi komórki bakteryjnej na stres oraz ich regulacja**. Postępy Mikrobiologii, T.53; nr 4, str. 305–317.

109 Parish T., 2014, **Two-Component Regulatory Systems of Mycobacteria**. Microbiol Spectr. Feb; 2(1):MGM2-0010-2013.

110 Parker W.B., Long M.C., 2008, **Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development**. Curr Pharm Des. 13(6):599-608.

111 Pawełczyk J., Brzostek A., Minias A., Płociński P., Rumijowska-Galewicz A., Strapagiel D., Zakrzewska-Czerwińska J., Dziadek J., 2021, **Cholesterol-dependent transcriptome remodeling reveals new insight into the contribution of cholesterol to *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis**. Sci Rep. Jun 11; 11(1):12396.

112 Percival S.L., Williams D.L., 2014, **Chapter Nine – Mycobacterium**. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition), Academic Press, Pages 177-207.

113 Peterson E.J.R., Brooks A.N., Reiss D.J., Kaur A., Wu W-J., Morrison R., Srinivas V., Turkarslan S., Pan M., Carter W., Arrieta-Ortiz M.L., Ruiz R.A., Bhatt A., Baliga N.S., 2021, **MtrA regulation of essential peptidoglycan cleavage in *Mycobacterium tuberculosis* during infection**, bioRxiv. .02.25.432019.

114 Petridis M., Benjak A., Cook G.M., 2015, **Defining the nitrogen regulated transcriptome of *Mycobacterium smegmatis* using continuous culture**. BMC Genomics. Oct 19; 16:821.

115 Płocińska R., Purushotham G., Sarva K., Vadrevu I.S., Pandeeti E.V., Arora N., Płociński P., Madiraju M.V., Rajagopalan M., 2012, **Septal localization of the *Mycobacterium tuberculosis* MtrB sensor kinase promotes MtrA regulon expression**. J Biol Chem. Jul 6; 287(28):23887-99.

116 Płocińska R., Wasik K., Płociński P., Lechowicz E., Antczak M., Błaszczyk E., Dziadek B., Słomka M., Rumijowska-Galewicz A., Dziadek J., 2022, **The Orphan Response Regulator Rv3143 Modulates the Activity of the NADH Dehydrogenase Complex (Nuo) in *Mycobacterium tuberculosis via* Protein-Protein Interactions**. Front Cell Infect Microbiol. Jun 28; 12:909507.

117 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 Res. Jun 20; 47(11):5892-5905.

118 Powell D., 2019, **drpowell/degust 4.1.1 (4.1.1)**. Zenodo.

119 Pullan S.T., Chandra G., Bibb M.J., Merrick M., 2011, **Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes**. BMC Genomics. Apr 4; 12:175.

120 Purushotham G., Sarva K.B., Blaszczyk E., Rajagopalan M., Madiraju M.V., 2015, ***Mycobacterium tuberculosi*s oriC sequestration by MtrA response regulator**. Mol Microbiol. Oct; 98(3):586-604.

121 Qi N., She G.L., Du W., Ye B.C., 2021, ***Mycobacterium smegmatis* GlnR Regulates the Glyoxylate Cycle and the Methylcitrate Cycle on Fatty Acid Metabolism by Repressing *icl* Transcription**. Front Microbiol. Feb 3; 12:603835.

122 Raczkowska A., Jaworska K., Wyrozemski L., Brzostek K., 2020, **Rola dwuskładnikowych szlaków transdukcji sygnału w oporności chorobotwórczych bakterii gram-ujemnych na związki antybakteryjne**, Postępy Mikrobiologii, tom 59, numer 3, s.259-276.

123 Rahlwes K.C., Dias B.R.S., Campos P.C., Alvarez-Arguedas S., Shiloh M.U., 2023, **Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis***. Virulence. Dec; 14(1):2150449.

124 Rahlwes Kathryn C., Dias Beatriz R.S., Campos Priscila C., Alvarez-Arguedas S., Shiloh Michael U., 2022, **Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis***. Virulence. Nov 23.

125 Rajagopalan M., Dziedzic R., Al Zayer M., Stankowska D., Ouimet M.C., Bastedo D.P., Marczynski G.T., Madiraju M.V., 2010, ***Mycobacterium tuberculosis* origin of replication and the promoter for immunodominant secreted antigen 85B are the targets of MtrA, the essential response regulator**. J Biol Chem. May 21; 285(21):15816-27.

126 Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P., 2011, **Integrative genomics viewer**. Nat Biotechnol. Jan;29(1):24-6.

127 Saini D.K., Malhotra V., Dey D., Pant N., Das T.K., Tyagi J.S., 2004, **DevR-DevS is a bona fide two-component system of *Mycobacterium tuberculosis* that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR**. Microbiology (Reading). Apr; 150(Pt 4):865-875.

128 Santucci P., Greenwood D.J., Fearns A., Chen K., Jiang H., Gutierrez M.G., 2021 **Intracellular localisation of *Mycobacterium tuberculosis* affects efficacy of the antibiotic pyrazinamide**. Nat Commun. Jun 21; 12(1):3816.

129 Serafini A., Tan L., Horswell S., Howell S., Greenwood D.J., Hunt D.M., Phan M.D., Schembri M., Monteleone M., Montague C.R., Britton W., Garza-Garcia A., Snijders A.P., VanderVen B., Gutierrez M.G., West N.P., de Carvalho L.P.S., 2019, ***Mycobacterium tuberculosis* requires glyoxylate shunt and reverse methylcitrate cycle for lactate and pyruvate metabolism**. Mol Microbiol. Oct; 112(4):1284-1307.

130 Shariq M., Quadir N., Alam A., Zarin S., Sheikh J.A., Sharma N., Samal J., Ahmad U., Kumari I., Hasnain S.E., Ehtesham N.Z., 2023, **The exploitation of host autophagy and ubiquitin machinery by *Mycobacterium tuberculosis* in shaping immune responses and host defense during infection**. Autophagy. Jan; 19(1):3-23.

131 Sharma A.K., Chatterjee A., Gupta S., Banerjee R., Mandal S., Mukhopadhyay J., Basu J., Kundu M., 2015, **MtrA, an essential response regulator of the MtrAB two-component system, regulates the transcription of resuscitation-promoting factor B of *Mycobacterium tuberculosis***. Microbiology (Reading). Jun; 161(6):1271-81.

132 Sharma S.K., Upadhyay V., 2020, **Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases**. Indian J Med Res. Sep; 152(3):185-226.

133 Sharma S.K., Upadhyay V., 2020, **Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases**. Indian J Med Res. Sep; 152(3):185-226.

134 Sherman D.R., Grundner C., 2014, **Agents of change - concepts in *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr/Tyr phosphosignalling**. Mol Microbiol. Oct; 94(2):231-41.

135 Shi A., Fan F., Broach J.R., 2022, **Microbial adaptive evolution**. J Ind Microbiol Biotechnol. Apr 14; 49(2):kuab076.

136 Shi J., Feng Z., Xu J., Li F., Zhang Y., Wen A., Wang F., Song Q., Wang L., Cui H., Tong S., Chen P., Zhu Y., Zhao G., Wang S., Feng Y., Lin W., 2023, **Structural insights into the transcription activation mechanism of the global regulator GlnR from actinobacteria**. Proc Natl Acad Sci U S A. May 30; 120(22):e2300282120.

137 Shrivastava R., Ghosh A.K., Das A.K., 2009, **Intra- and intermolecular domain interactions among novel two-component system proteins coded by Rv0600c, Rv0601c and Rv0602c of *Mycobacterium tuberculosis***. Microbiology (Reading). 2009 Mar; 155(Pt 3):772-779.

138 Simcox B.S., Tomlinson B.R., Shaw L.N., Rohde K.H., 2023, ***Mycobacterium abscessus* DosRS two-component system controls a species-specific regulon required for adaptation to hypoxia**. Front Cell Infect Microbiol. Mar 9; 13:1144210.

139 Singh K.K., Athira P.J., Bhardwaj N., Singh D.P., Watson U., Saini D.K., 2021**, Acetylation of Response Regulator Protein MtrA in *M. tuberculosis* Regulates Its Repressor Activity**. Front Microbiol. Jan 15; 11:516315.

140 Srivastava A., Summers M.L., Sobotka R., 2020, **Cyanobacterial sigma factors: Current and future applications for biotechnological advances**. Biotechnol Adv. May-Jun; 40:107517.

141 Stupar M., Furness J., De Voss C.J., Tan L., West N.P., 2022, **Two-component sensor histidine kinases of *Mycobacterium tuberculosis*: Beacons for niche navigation**. Mol Microbiol. May; 117(5):973-985.

142 Stupar M., Tan L., Kerr E., De Voss C., Forde B., Schulz B., West N.P., 2023, **TcrXY is an acid-sensing two-component transcriptional regulator of *Mycobacterium tuberculosis* and a novel target for enhanced TB therapy**. Research Square, 25 April.

143 Tan Y., Zhang Q.S., Zhao W., Liu Z., Ma M.Y., Zhong M.Y., Wang M.X., Xu B., 2020, **Chlororespiration Serves as Photoprotection for the Photo-Inactivated Oxygen-Evolving Complex in Zostera marina, a Marine Angiosperm**. Plant Cell Physiol. Aug 1; 61(8):1517-1529.

144 Tang H., Ju X., Zhao J., Li L., 2021, **Engineering ribose-5-phosphate isomerase B from a central carbon metabolic enzyme to a promising sugar biocatalyst**. Appl Microbiol Biotechnol. Jan; 105(2):509-523.

145 Tierney A.R., Rather P.N., 2019, **Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance**. Future Microbiol. Apr; 14(6):533-552.

146 Tiwari S., Jamal S.B., Hassan S.S., Carvalho P.V.S.D., Almeida S., Barh D., Ghosh P., Silva A., Castro T.L.P., Azevedo V., 2017, **Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview**. Front Microbiol. Oct 10; 8:1878.

147 Tybulski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A., 2008, **PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych**. Biotechnologia. 1(80), 86-96.

148 van Hoek M.L., Hoang K.V., Gunn J.S., 2019, **Two-Component Systems in *Francisella* Species**. Front Cell Infect Microbiol. Jun 12; 9:198.

149 van Spanning R.J.M., Guan Q., Melkonian C., Gallant J., Polerecky L., Flot J.F., Brandt B.W., Braster M., Iturbe Espinoza P., Aerts J.W., Meima-Franke M.M., Piersma S.R., Bunduc C.M., Ummels R., Pain A., Fleming E.J., van der Wel N.N., Gherman V.D., Sarbu S.M., Bodelier P.L.E., Bitter W., 2022, **Methanotrophy by a Mycobacterium species that dominates a cave microbial ecosystem**. Nat Microbiol. Dec; 7(12):2089-2100.

150 Verma M., Lal D., Kaur J., Saxena A., Kaur J., Anand S., Lal R., 2013, **Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences**. Res Microbiol. Sep; 164(7):718-28.

151 Wang J., Wang Y., Zhao G.P., 2015, **Precise characterization of GlnR Box in actinomycetes**. Biochem Biophys Res Commun. Mar 13; 458(3):605-607.

152 White D.W., Elliott S.R., Odean E., Bemis L.T., Tischler A.D., 2018, ***Mycobacterium tuberculosis* Pst/SenX3-RegX3 Regulates Membrane Vesicle Production Independently of ESX-5 Activity**. mBio. Jun 12; 9(3):e00778-18.

153 Wolanin P.M., Thomason P.A., Stock J.B., 2002, **Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom**. Genome Biol. Sep 25; 3(10):REVIEWS3013.

154 Xie Y., Li J., Ding Y., Shao X., Sun Y., Xie F., Liu S., Tang S., Deng X., 2022, **An atlas of bacterial two-component systems reveals function and plasticity in signal transduction**. Cell Rep. Oct 18; 41(3):111502.

155 Xing D., Ryndak M.B., Wang L., Kolesnikova I., Smith I., Wang S., 2017, **Asymmetric Structure of the Dimerization Domain of PhoR, a Sensor Kinase Important for the Virulence of *Mycobacterium tuberculosis***. ACS Omega. Jul 31; 2(7):3509-3517.

156 Xu Y., P., Borah K., 2022, ***Mycobacterium tuberculosis* carbon and nitrogen metabolic fluxes.** Biosci Rep. Feb 4; 42(2):BSR20211215.

157 Xu Y., You D., Ye B.C., 2021, **RegX3 Controls Glyoxylate Shunt and Mycobacteria Survival by Directly Regulating the Transcription of Isocitrate Lyase Gene in *Mycobacterium smegmatis***. ACS Infect Dis. Apr 9; 7(4):927-936.

158 Yamada H., Yamaguchi M., Igarashi Y., Chikamatsu K., Aono A., Murase Y., Morishige Y., Takaki A., Chibana H., Mitarai S., 2018, ***Mycolicibacterium smegmatis*, Basonym *Mycobacterium smegmatis*, Expresses Morphological Phenotypes Much More Similar to *Escherichia coli* Than *Mycobacterium tuberculosis* in Quantitative Structome Analysis and CryoTEM Examination**. Front Microbiol. Sep 11; 9:1992.

159 Yao L.L., Liao C.H., Huang G., Zhou Y., Rigali S., Zhang B., Ye B.C., 2014, **GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in the actinomycete *Saccharopolyspora erythraea***. Appl Microbiol Biotechnol. Sep; 98(18):7935-48.

160 Zahrt T.C., Deretic V., 2000, **An essential two-component signal transduction system in *Mycobacterium tuberculosis***. J Bacteriol. Jul; 182(13):3832-8.

161 Zhang C., Anderson A.J., 2013, **The gluconeogenic pathway in a soil mycobacterium isolate with bioremediation ability**. Curr Microbiol. Feb; 66(2):122-31.

162 Zhou Y., Wei W., Fleming J., Ye C., Zheng S., Liu F., Zhou L., Bi L., Liu W., 2020, ***Mycobacterium smegmatis* MSMEG_0129 is a nutrition-associated regulator that interacts with CarD and ClpP2**. Int J Biochem Cell Biol. Jul; 124:105763.

163 Zhu Y., Zhang P., Zhang J., Xu W., Wang X., Wu L., Sheng D., Ma W., Cao G., Chen X.L., Lu Y., Zhang Y.Z., Pang X., 2019, **The developmental regulator MtrA binds GlnR boxes and represses nitrogen metabolism genes in *Streptomyces coelicolor***. Mol Microbiol. Jul; 112(1):29-46.

164 Zschiedrich C.P., Keidel V., Szurmant H., 2016, **Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction**. J Mol Biol. Sep 25; 428(19):3752-75.