

## Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. "Charakterystyka białek RepB i ich udział w aktywnej segregacji plazmidów *Rhizobium leguminosarum*"

Rizobia to bakterie glebowe, zdolne do symbiotycznych interakcji z roślinami bobowatymi, które prowadzą do tworzenia brodawek na korzeniach lub pędach. Wewnątrz brodawek bakterie, przekształcone w bakteroidy, wiążą azot atmosferyczny i dostarczają go roślinom w zredukowanej postaci. Zdolność rizobiów do redukcji  $N_2$  pozwala roślinom na wzrost nawet w warunkach ograniczonej ilości azotu w glebie. Symbioza rizobia-rośliny motylkowate jest wydajnym, naturalnym systemem pozwalającym na znaczne ograniczenie nawożenia azotowego, co jest istotne dla tzw. zrównoważonego rolnictwa. Badania podstawowe dotyczące różnych aspektów symbiozy mają duże znaczenie z punktu widzenia agrobiotechnologii, stwarzają bowiem szansę na zastosowanie wyselekcjonowanych, lub odpowiednio zmodyfikowanych rizobiów jako bionawozów.

Genomy rizobiów są zwykle złożone z chromosomu oraz jednego lub kilku dużych plazmidów, które są niskokopijne, co wymaga obecności ściśle kontrolowanych systemów partycyjnych pozwalających na stabilne dziedziczenie replikonów. W rizobiach dystrybucja zreplikowanych kopii plazmidów do komórek potomnych zależy od procesu aktywnej segregacji.

W aktywnej segregacji uczestniczą: sekwencja centromeropodobna, białko wiążące się z tą sekwencją (CBP – centromere binding protein, np. ParB) i NTP-aza, która jest motorem napędowym procesu segregacji (np. ParA). W procesie partycji plazmidu białko CBP rozpoznające sekwencję centromeropodobną łączy się z nią tworząc kompleks nukleoproteinowy (zwany segrosomem), rozpoznawany przez NTPazę, która polimeryzując, tworzy filamenty pozwalające na przeniesienie zreplikowanych plazmidów do komórek potomnych.

W plazmidach rizobiów geny kodujące poszczególne białka odpowiedzialne za proces partycji, jak również sekwencje centromeropodobne są zlokalizowane w jednym operonie razem z genem dla białka inicjującego proces replikacji plazmidu, tworząc replikon typu *repABC*. Gen *repA* koduje ATP-azę, podobną do ParA faga P1. Gen *repB* koduje białko należące do rodziny CBP (odpowiednik ParB), natomiast *repC* koduje białko inicjujące replikację plazmidu. Niska liczba kopii i stabilność segregacyjna sprawia, że replikony *repABC* mogą

znaleźć zastosowanie w biotechnologii molekularnej np. do konstrukcji wektorów umożliwiających modyfikacje genomów bakterii glebowych.

Genom *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (RtTA1) składa się z pięciu replikonów: chromosomu i czterech plazmidów, z których każdy jest wyposażony w kasetę genów *repABC*.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie białek typu CBP (RepB) kodowanych w kasetach *repABC* plazmidów RtTA1 oraz określenie ich roli w procesie aktywnej segregacji wszystkich czterech replikonów pozachromosomalnych tego szczepu.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że poszczególne plazmidy szczepu RtTA1 wyposażone są w funkcjonalne kasety genów *repABC*, które zapewniają im replikację i stabilne utrzymywanie się w komórkach rizobiów. W obrębie tych kaset można wyróżnić moduł replikacyjny i partycyjny. Moduł replikacyjny (*repC*) może inicjować replikację, natomiast moduł partycyjny (*repAB*) zapewnia stabilne utrzymywanie się plazmidów w populacji dzielących się komórek. Wykazano, że kluczowym elementem modułów partycyjnych są sekwencje centromeropodobne *parS*. Dla sprawnego działania kaset partycyjnych zawierających geny *repAB* niezbędny był, co najmniej jeden taki element. W toku przeprowadzonych doświadczeń udowodniono, że poszczególne białka RepB wiążą się specyficznym do sekwencji centromeropodobnych *parS* pochodzących tylko z macierzystego plazmidu. Nie wykryto krzyżowych oddziaływań pomiędzy białkami RepB i elementami *parS* pochodzącymi z różnych plazmidów badanego szczepu. Ponadto stwierdzono, że wszystkie białka RepB szczepu RtTA1 mają zdolność do oligomeryzacji i w roztworze tworzą co najmniej formy dimeryczne. Dodatkowo, na przykładzie RepB pRleTA1b określono domenową budowę białek RepB. Ustalono, że w N-końcowej części białka RepB zlokalizowana jest domena odpowiedzialna za interakcję z RepA, w centralnej części zidentyfikowano motyw HTH pozwalający na specyficzne rozpoznanie i związanie sekwencji centromeropodobnej *parS*, natomiast w C-końcowej części białka domenę oligomeryzacyjną. Udowodniono, że dimeryzacja RepB jest niezbędnym etapem prowadzącym do związania sekwencji *parS*.

Podsumowując, przedstawione wyniki dowodzą, że plazmidy RtTA1 są wyposażone w funkcjonalne replikony *repABC*, które mają strukturę modułową zapewniającą im zdolność do replikacji i stabilność segregacyjną. Kluczowym elementem zgodnej koegzystencji w jednej komórce bakteryjnej kilku plazmidów *repABC* wyposażonych w bardzo podobne systemy partycyjne jest specyficzność interakcji pomiędzy białkami CBP – RepB i elementami centromeropodobnymi *parS*. Specyficzność ta wynika z dużego zróżnicowania białek RepB na

poziomie struktury pierwszorzędowej, jak również sekwencji elementów *parS* rozpoznawanych przez te białka.