

**Andrzej Mazur**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
Wydział Biologii i Biotechnologii

**Autoreferat**

Lublin 2012

**dr Andrzej Mazur**

Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin  
mazur@hektor.umcs.lublin.pl  
tel.+48 81 537-59-68, fax +48 81 537-59-59

## AUTOREFERAT

### POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

<b>1997</b>	<b>Magister biotechnologii</b> Praca magisterska pt.: "Systemy transportu substratów w <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i> TA1 w aspekcie funkcjonalnej komplementacji z układem sekrecji proteaz <i>Erwinia chrysanthemi</i> " Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
<b>2002</b>	<b>Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii</b> Rozprawa doktorska pt.: "Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów <i>pssNOP</i> kontrolujących biosyntezę egzopolisacharydu <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> TA1" Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

### INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

10.1997 - 05.1999	Uczestnik Studiów Doktoranckich na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie
06.1999 - 02. 2003	Asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS
od 01.03.2003	Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii UMCS

## PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ

### Praca magisterska

Pracę naukowo-badawczą rozpocząłem w zespole kierowanym przez prof. dr hab. Annę Skorupską w roku 1995 jako student IV roku kierunku Biotechnologia, Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W latach 1996-1997 otrzymywałem stypendium Ministra Edukacji Narodowej za bardzo dobre wyniki w nauce i pracę naukową. Przeprowadzone przeze mnie badania wpisywały się w ogólną tematykę badawczą Zakładu Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecna nazwa Zakład Genetyki i Mikrobiologii), które dotyczą genetycznych uwarunkowań oddziaływań symbiotycznych między bakteriami z rodzaju *Rhizobium* i roślinami motylkowatymi. Miały one na celu sprawdzenie, czy hipotetyczny system transportu złożony z białek PrsDE i Orf3 może eksportować na zewnątrz komórki bakteryjnej heterologiczny substrat, którym była proteaza PrtB *E. chrysanthemi*. Białka te są kodowane przez geny *prsDE*, *orf3* zidentyfikowane w regionie odpowiedzialnym za biosyntezę egzopolisacharydu (EPS) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Podstawą do badania zdolności transkomplementacji procesów sekrecyjnych w układzie, w którym poszczególne elementy pochodzą z różnych systemów transportu, było podobieństwo aminokwasowe obydwu systemów sekrecji. Uzyskane transformanty *E. coli*, zawierające po dwa zrekombinowane plazmidy ze sklonowanymi genami *prs* i *prtB* badano pod kątem aktywności proteolitycznej stosując testy płytkowe oraz zymografię. Wyniki tych doświadczeń pozwalały przypuszczać, że taka komplementacja sekrecji może występować, jednakże na bardzo niskim poziomie: obserwowana aktywność proteolityczna skonstruowanych szczepów *E. coli* była niska. Badania te zostały opisane w pracy magisterskiej pt. „Systemy transportu substratów w *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA1 w aspekcie funkcjonalnej komplementacji z układem sekrecji proteaz *Erwinia chrysanthemi*”, którą obroniłem w czerwcu 1997 r. z wynikiem bardzo dobrym. Wyniki badań stanowiących przedmiot mojej pracy magisterskiej zostały częściowo opublikowane w pracy:

- **Mazur A.**, Wielbo J., Król J., Kopcińska J., Lotocka B., Golinowski W., Skorupska A. (1998) Molecular characterization and symbiotic importance of *prsD* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. *Acta Biochim. Pol.* 45:1067-1073.

**IF<sub>1998</sub>=0.477**

## Praca doktorska

Po uzyskaniu tytułu magistra kontynuowałem pracę w zespole prof. dr hab. Anny Skorupskiej – początkowo jako uczestnik studiów doktoranckich UMCS (październik 1997 – maj 1999 r.), a następnie (od czerwca 1999 r.) jako asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej. Prowadzone przeze mnie badania koncentrowały się na problemach badawczych zespołu związanych z genetyczną kontrolą biosyntezy egzopolisacharydu (EPS) *Rhizobium* oraz jego roli w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną (*Trifolium pratense*). EPS w symbiozie odgrywa istotną rolę, ponieważ jest czynnikiem warunkującym efektywne zakażenie rośliny i wiązanie azotu atmosferycznego. Badania jakie wykonywałem w latach 1997-2002 dotyczyły systemów transportu typu ABC odpowiedzialnych za eksport zewnątrzkomórkowych polisacharydów w *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. Uzyskane wyniki złożyły się na moją rozprawę doktorską pt. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów *pssNOP* kontrolujących biosyntezę egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1”. Tematyka pracy doktorskiej dotyczyła identyfikacji oraz analizy genetycznej i funkcjonalnej genów *pssNOP*, których produkty białkowe tworzą w *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 system transportu typu I odpowiedzialny za polimeryzację i transport egzopolisacharydu (EPS). Wykazałem, że białko PssP pełni funkcję błonowo-peryplazmatycznego białka pomocniczego typu MPA (Membrane Periplasmic Auxiliary) regulującego stopień polimeryzacji EPS, a PssN jest zlokalizowane w błonie zewnętrznej i należy do rodziny zewnątrz błonowych białek pomocniczych typu OMA (Outer Membrane Auxiliary). Rola białka PssO i jego udział w systemie transportu EPS, nie zostały do końca wyjaśnione, ale wykazano, że jest istotne w oddziaływaniach symbiotycznych pomiędzy rizobiami a rośliną motylkowatą, tzn. mutanty *pssO* były niezdolne do wiązania azotu. W trakcie badań zidentyfikowałem także gen *pssT*, który koduje kolejny istotny element w/w systemie: transporter specyficzny dla polisacharydów typu PST (Polysaccharide Specific Transporter). Posługując się fuzjami transkrypcyjnymi z genami reporterowymi zbadałem aktywność transkrypcyjną regionu *pssTNOP* oraz topologię błonową wybranych białek systemu transportu typu I.

Pracę doktorską obroniłem 04.12.2002.

W tym czasie uczestniczyłem także w pracach dotyczących funkcjonowania innych genów biosyntezy polisacharydów (mutageneza, badania aktywności transkrypcyjnej) m.in. w ramach realizowanego w zespole projektu KBN pt. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów *pss* kontrolujących biosyntezę kwaśnego egzopolisacharydu

*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” (6 P04A 05818, lata 2000-2003) kierowanego przez prof. dr hab. Annę Skorupską, w którym byłem jednym z wykonawców. Przeprowadzone badania opisano w 4 publikacjach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, których byłem współautorem:

1. Król J., Wielbo J., **Mazur A.**, Kopcińska J., Łotocka B., Golinowski W., Skorupska A. (1998) Molecular characterization of *pssCDE* genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1: *pssD* mutant is affected in exopolysaccharide synthesis and endocytosis of bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 1142-1148.  
**IF<sub>1998</sub>=3.450**
2. Janczarek M., Król J., Kutkowska J., **Mazur A.**, Wielbo J., Borucki W., Kopcińska J., Łotocka B., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2001) Mutation in *pssB-pssA* intergenic region of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* affects the surface polysaccharides synthesis and nitrogen fixation ability. *J. Plant Physiol.* 158: 1565-1574.  
**IF<sub>2001</sub>=1.180**
3. **Mazur A.**, Król J., Skorupska A. (2001) Isolation and sequencing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *pssN*, *pssO* and *pssP* genes encoding the proteins involved in polymerization and translocation of exopolysaccharide. *DNA Seq.* 12: 1-12.  
**IF<sub>2001</sub>=0.594**
4. **Mazur A.**, Król J., Wielbo J., Urbanik-Sypniewska T., Skorupska A. (2002) *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* PssP protein is required for exopolysaccharide biosynthesis and polymerization. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 388-397.  
**IF<sub>2002</sub>=3.845**

oraz 13 krajowych i międzynarodowych doniesieniach konferencyjnych.

Wymienione publikacje były nagrodzone m.in.:

- nagrodą zespołową II stopnia Rektora UMCS (rok 1998),
- nagrodą zespołową Polskiego Towarzystwa Genetycznego (rok 2001)
- nagrodą zespołową Komitetu Organizacyjnego Krajowego Kongresu Biotechnologii (rok 2003)

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zostałem zatrudniony od 1 marca 2003 r. na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie **Zakład Genetyki i Mikrobiologii**), w którym pracuję do dnia dzisiejszego.

## Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora (2003-2012)

### Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje:

- 15 oryginalnych prac naukowych w tym 13 w czasopismach z listy JCR;
- 5 artykułów przeglądowych w tym 2 w czasopismach z listy JCR;
- 4 referaty wygłoszone na konferencjach, w tym 1 na konferencji międzynarodowej;
- 37 doniesień zjazdowych, w tym 21 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych
- 438 zgłoszonych rekordów sekwencji nukleotydowych w bazie danych GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI)

### Wyniki badań stanowiące:

#### OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE REALIZUJĄCE ART. 16 UST. 2 USTAWY O STOPNIACH NAUKOWYCH

##### Tytuł:

**Organizacja i zmienność genomu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: molekularna analiza regionów genomu istotnych dla adaptacji do endosymbiotycznego i glebowego środowiska**

### Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego:

(8 oryginalnych prac eksperymentalnych i 2 prace przeglądowe):

1. **Mazur A.**, Król J., Marczak M., Skorupska A. (2003) Membrane topology of PssT, the transmembrane protein component of type I exopolysaccharide transport system in the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain TA1. *J. Bacteriol.*, 185: 2503-2511.  
**IF<sub>2003</sub>: 4,175**      **MNiSW: 35**
2. Wielbo J., **Mazur A.**, Król J.E., Marczak M., Kutkowska J., Skorupska A. (2004) Complexity of phenotypes and symbiotic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* exopolysaccharide mutants. *Arch. Microbiol.*, 182: 331–336.  
**IF<sub>2004</sub>: 2,374**      **MNiSW: 20**

3. **Mazur A.**, Marczak M., Król J.E. and Skorupska A. (2005) Topological and transcriptional analysis of *pssL* gene product: a putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.*, 184: 1-10.  
**IF<sub>2005</sub>: 2,135**      **MNiSW: 20**
4. Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, **Mazur A**, Król J. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 5:7.  
**IF<sub>2006</sub>: 2,59**      **MNiSW: 40**
5. Król J., **Mazur A.**, Marczak M., Skorupska A. (2007). Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*, 89: 237-247.  
**IF<sub>2007</sub>: 3,613**      **MNiSW: 30**
6. Król J., **Mazur A.**, Marczak M., Skorupska A. (2008). Application of physical and genetic map of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 to comparison of three closely related rhizobial genomes. *Mol. Genet Genomics* 279, 107-121.  
**IF<sub>2008</sub>: 2,838**      **MNiSW: 25**
7. Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., **Mazur A.**, Kubik-Komar A., Skorupska A. (2010) Genetic and metabolic divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population recovered from clover nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 4593-4600.  
**IF<sub>2010</sub>: 3,778**      **MNiSW: 40**
8. **Mazur A.**, Majewska B., Stasiak G., Wielbo J., Skorupska A. (2011) *repABC*-based replication systems of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 plasmids: incompatibility and evolutionary analyses. *Plasmid*, 66: 53-66.  
**IF<sub>2011</sub>: 1,516**      **MNiSW: 20**
9. **Mazur A.**, Stasiak G., Wielbo J., Kubik-Komar A., Marek Kozaczuk M., Skorupska A. (2011) Intragenomic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates. *BMC Microbiol.*, 11:123.  
**IF<sub>2011</sub>: 3,044**      **MNiSW: 30**
10. **Mazur A.**, Koper P. (2012) Rhizobial plasmids - replication, structure and biological role. *Central European Journal of Biology* 7, 571-586.  
**IF<sub>2011</sub>: 1,0**      **MNiSW: 20**

Łączny *impact factor* w.w. publikacji zgodnie z rokiem opublikowania:      **27,063**

Suma punktów za w.w. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW      **280 pkt**

## Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników

### WPROWADZENIE – przedmiot badań

Rhizobia to bakterie glebowe zdolne do tworzenia mutualistycznych układów symbiotycznych z roślinami motylkowatymi. Mikrosymbiont (*Rhizobium*) zakażając korzeń lub łodygę rośliny tworzy struktury zwane brodawkami, wewnątrz których wiąże (redukuje) azot atmosferyczny do łatwo przyswajalnych związków azotowych transportowanych do makrosymbionta (rośliny motylkowatej). W zamian roślina dostarcza bakteriom węglowodanów - produktów fotosyntezy. Symbioza rizobiów z roślinami motylkowatymi jest kluczowym procesem w obiegu azotu w biosferze, a także wydajnym, naturalnym systemem, pozwalającym na znaczne ograniczenie nawożenia azotowego i rozwój tzw. zrównoważonego rolnictwa. Znaczenie badań nad tą unikalną grupą bakterii wynika z możliwości manipulowania ich genomami w celu uzyskania zwiększonej wydajności wiązania azotu.

Nawiązanie symbiozy jest złożonym procesem, wymagającym precyzyjnego rozpoznania partnerów, które opiera się na wymianie sygnałów molekularnych, pomiędzy makro- i mikrosymbiontem, spośród których najważniejszymi są roślinne flawonoidy oraz oligosacharydy lipochitynowe (LCO), tzw. czynniki Nod tworzone przez rizobia. Jednym z ważnych bakteryjnych sygnałów symbiotycznych są także składniki polisacharydowych struktur powierzchniowych, m.in. egzopolisacharyd (EPS), który jest istotnym czynnikiem infekcyjności rizobiów zakażających rośliny tworzące brodawki o trwałym merystemie.

Genomy rizobiów są duże i w większości gatunków (zwłaszcza tzw. rizobiów szybkożyjących) podzielone na chromosom (tzw. *core genome*) i jeden lub kilka dużych plazmidów, które ze względu na wielkość nazywane są megaplazmidami. Struktura genomów jest kształtowana zarówno przez złożone środowisko bytowania rizobiów, czyli glebę, jak też przez środowisko endosymbiotyczne. Plazmidy, czyli pozachromosomalne elementy genetyczne, są często określane mianem „genomu pomocniczego” (*accessory genome*): pozwalają bowiem na przechowywanie części dodatkowej informacji, tworząc tym samym znaczny potencjał metaboliczny (adaptacyjny), który może być wykorzystany w odpowiednich warunkach żywieniowych czy stresowych w glebie lub w roślinie (w stanie wegetatywnym lub endosymbiotycznym). Taka struktura genomu uważana jest za jeden z elementów konkurencyjności bakterii w środowisku, w którym dostępność substancji odżywczych bywa często ograniczona. Z drugiej strony jest także przyczyną znacznej



plastyczności genomu głównie na skutek wewnątrzgenomowych rearanżacji oraz nabywania innych plazmidów drogą horyzontalnego transferu, co jest charakterystyczne dla rizobiów.

Gatunek *Rhizobium leguminosarum* obejmuje trzy biowary (biotypy): *viciae*, *trifolii* i *phaseoli* (z którego wydzielono kilka nowych gatunków m. in. *Rhizobium etli*, *R. phaseoli* czy *R. pisi*), różniące się specyficnością zakażenia roślin motylkowatych. W ciągu ostatnich lat zgromadzono wiele danych dotyczących właściwości genetycznych i fenotypowych blisko spokrewnionych gatunków *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *R. etli*. Modelem przedstawionych badań był symbiont koniczyny ***R. leguminosarum* bv. *trifolii*** szczep RtTA1 oraz szczepy glebowe izolowane z brodawek koniczyny. Badania nad tymi szczepami pozwoliły na uzyskanie obrazu zmienności i ewolucji molekularnej gatunku *R. leguminosarum*. Zrealizowany plan badań zakładał analizę organizacji genomu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (*Rlt*) oraz zakresu jego zmienności. Szczególny nacisk położono na molekularną analizę regionów genomu *Rlt* istotnych zarówno dla saprofitycznego jak i symbiotycznego trybu życia rizobiów, jakimi są skupiska genów uczestniczących w biosyntezie powierzchniowych polisacharydów oraz geny zlokalizowane na megaplazmidach. Analiza puli plazmidowego DNA *Rlt* była także próbą odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób pozachromosomalny DNA wpływa na potencjał metaboliczny rizobiów kształtujący ich adaptację do zmiennego środowiska.

## OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

W toku realizacji planu badawczego określono organizację genomu RtTA1, na który składa się chromosom i cztery megaplazmidy oznaczone pRleTA1a-pRleTA1d. Stosując kombinację mapowania restrykcyjnego wysokocząsteczkowego DNA, elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) oraz serii hybrydyzacji Southerna skonstruowano mapę fizyczną genomu RtTA1 umieszczając na niej ponad 100 markerów genetycznych (*Mol. Genet Genomics*, 2008). Ze względu na wysoką zawartość par G+C w zsekwencjonowanych genomach rizobiów do konstrukcji mapy fizycznej RtTA1 wybrano enzymy restrykcyjne rozpoznające 8-nukleotydowe sekwencje bogate w pary A+T oraz enzym I-CeuI, który rozpoznaje konserwatywne 26 nt sekwencje w obrębie operonów dla rybosomalnego RNA (*rrn*). Na podstawie analizy fragmentów restrykcyjnych całkowitą wielkość genomu oszacowano na  $7257 \pm 8$  kpz. Wielkości plazmidów zawierały się w przedziale od 476 do 808 kpz. Najmniejszy plazmid pRleTA1a oznaczono jako plazmid symbiotyczny (pSym), ponieważ na nim zidentyfikowano geny bezpośrednio odpowiedzialne za symbiotyczne

interakcje z koniczyną (*nod-nif*). Na chromosomie zidentyfikowano trzy operony *rrn* zlokalizowane, podobnie jak w innych genomach bakteryjnych, w pobliżu *origin* replikacji. W sąsiedztwie hipotetycznego *ori* replikacji chromosomu RTA1 zidentyfikowano też inne istotne geny podstawowego metabolizmu, takie jak *dnaK* czy *rpoH*.

Opracowaną mapę makro-restrykcyjną i genetyczną genomu RtTA1 wykorzystano do porównania organizacji całych chromosomów trzech blisko spokrewnionych bakterii tj. RtTA1, *R. leguminosarum* bv. *viciae* szczep 3841 (*Rlv*) oraz *R. etli* szczep CFN42 (*Rhe*). Analiza porównawcza map genetycznych bakterii należących do tego samego rodzaju, jak również szczepów blisko spokrewnionych (wewnątrzgatunkowo), zwane genomiką mikroewolucyjną pozwalają uzyskać informacje dotyczące konserwacji układu genów na chromosomach, a także pozwalają na określenie mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za rearanżacje genomowe. W przypadku genomów rizobiowych ocena stopnia kolinearności jest szczególnie ciekawa, ze względu na ich niestabilność i skłonność do rearanżacji zarówno na skutek wewnętrznych przegrupowań, jak i na drodze horyzontalnego transferu DNA. Wykazano znaczną kolinearność (czyli podobny układ markerów genetycznych) na całej długości chromosomów tych gatunków, co pozwoliło na wniosek, iż ewolucyjna dywergencja gatunków *R. leguminosarum* i *R. etli* od hipotetycznego wspólnego przodka nie pociągnęła za sobą znacznych rearanżacji chromosomów, przy widocznych potencjalnych śladach horyzontalnego transferu, duplikacji lub utraty pewnych odcinków DNA - zjawisk charakterystycznych dla plastycznych i niestabilnych genomów rizobiowych. Mimo znacznego podobieństwa chromosomalnego DNA, genomy RtTA1, *Rlv* and *Rhe* wyraźnie różniły się, m.in. dystrybucją materiału genetycznego pomiędzy poszczególne plazmidy, co może przekładać się na różnice w potencjale adaptacyjnym bakterii, włączając symbiotyczne interakcje z rośliną.

Uzupełnieniem prac dotyczących organizacji i zmienności genomu *Rlt* były badania przeprowadzone na ważnych obszarach genomu RtTA1 jakimi są regiony odpowiedzialne za biosyntezę powierzchniowych polisacharydów (*Genomics, 2007*). Analiza klonów biblioteki genomowej RtTA1 skonstruowanej w sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC) doprowadziła do identyfikacji pięciu dużych skupisk genów oznaczonych Pss-I - Pss-V (ang. *polysaccharide synthesis*) oraz szeregu pojedynczych genów biosyntezy polisacharydów rozproszonych w genomie. Większość z nich zlokalizowano na chromosomie RtTA1, tylko region oznaczony jako Pss-III zmapowano na plazmidzie pRleTA1b. Największy region Pss-I, zawierał 24 geny, kodujące glikozylotransferazy, enzymy modyfikujące podstawową podjednostkę EPS oraz białka odpowiedzialne za polimeryzację i wyprowadzanie EPS poza

komórkę. Ten region uznano za główne zgrupowanie genów odpowiedzialnych za biosyntezę egzopolisacharydu w *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, ponieważ opisano w nim szereg mutacji, których efektem był brak syntezy EPS. Komputerowa analiza przewidywanych funkcji białek kodowanych przez geny zlokalizowane w regionach Pss-II (14 kpz, 10 genów), Pss-IV (10 kpz, 10 genów) oraz Pss-V (3 kpz, 4 geny), sugeruje ich udział w biosyntezie lipopolisacharydu (LPS) RtTA1. Region Pss-III zidentyfikowany na plazmidzie zawiera 7 genów, których hipotetyczne produkty białkowe to przede wszystkim glikozylotransferazy.

Wyniki analizy regionów Pss dostarczyły wielu informacji dotyczących mikroewolucji genomu RtTA1 na tle całego gatunku *R. leguminosarum*. Odnosząc je do badań nad organizacją genomu *Rlt* stwierdzono, że duża liczba regionów Pss wskazuje na charakterystyczny dla genomów rizobiowych "nadmiar" informacji genetycznej z powtórzeniami licznych genów (wśród zidentyfikowanych w RtTA1 genów *pss* było wiele paralogów np. *pssP* i *pssP2*, *pssA* i *pssA2*, powtórzenia *lpsB*). Z drugiej strony, ewolucyjne ulokowanie większości z genów *pss* na chromosomie, wskazuje na ich przynależność do tzw. genomu rdzeniowego (*core genome*) i świadczy o ich istotności dla prawidłowego funkcjonowania komórki.

W celu określenia przynależności poszczególnych regionów i skupisk genów *pss* RtTA1 do tzw. rdzeniowych lub dodatkowych elementów genomu wykonano komputerową analizę zawartości par G+C oraz zmienności zawartości G+C w trzeciej, zmiennej pozycji kodonu (GC3S). Część rdzeniowa genomu, zwykle chromosomalna, ma wyższą wartość G+C, podczas, gdy dodatkowe elementy genomu mają niższą zawartość G+C i są zlokalizowane głównie na plazmidach lub na wyspach chromosomalnych. Stwierdzono, że chromosomalne regiony Pss-II, Pss-IV, Pss-V wykazują wartości tych parametrów typowe dla tzw. rdzeniowych elementów genomu, podczas gdy parametry plazmidowego regionu Pss-III wskazują na typowy charakter dodatkowego elementu genomu RtTA1. W przypadku chromosomalnego regionu Pss-I, wartości %GC oraz GC3S, są niższe niż plazmidowego regionu Pss-III. Takie cechy w przypadku chromosomalnej, rdzeniowej części genomu, mogą oznaczać ewolucyjne przeniesienie regionu Pss-I z innego replikonu lub jego zewnątrzgatunkowe pochodzenie i charakter "wyspy" genomowej, wskazując tym samym na mozaikową strukturę genomu RtTA1 i złożoną historię ewolucyjną. Skupiska Pss wykazywały znaczny poziom syntenii i kolinearności (konserwatywnej zawartości i układu genów) w porównaniu z genomami *Rlv* oraz *Rhe*. Zachowawczość układu genów i samej sekwencji DNA w obrębie regionów Pss świadczy o ich znaczeniu zarówno dla metabolizmu komórki jak i dla symbiozy z rośliną. Ewolucyjna zachowawczość układu i sąsiedztwa genów

jest też zwykle istotna dla utrzymania określonego potencjału adaptacyjnego genomu, w którym produkty białkowe leżących obok siebie genów uczestniczą w podobnych procesach komórkowych, co tłumaczy konserwację układu genów. Taki konserwatywny układ genów obserwujemy w obrębie plazmidowego regionu Pss-III, chociaż plazmidy są uważane za jedno z głównych źródeł zmienności i plastyczności genomu.

Równoległe do opisanych powyżej badań regionów biosyntezy polisacharydów wykonywanych z perspektywy zmiennej organizacji genomu *Rlt*, prowadziłem także prace dotyczące molekularnej funkcji poszczególnych genów uczestniczących w biosyntezie egzopolisacharydu (EPS). Ten nurt badań stanowił kontynuację prac będących przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej, w których zidentyfikowano i częściowo opisano składniki systemu transportu EPS na zewnątrz komórki bakteryjnej. W toku tych analiz wykazano, że mechanizm polimeryzacji i translokacji egzopolisacharydu w RtTA1 jest zależny od systemu typu Wzy/Wzx - charakterystycznego i rozpowszechnionego w bakteriach Gram-ujemnych, m.in. w *E. coli*, a który w RtTA1 tworzą białka PssT/PssL (*J. Bacteriol.*, 2003, *Arch. Microbiol.*, 2005). Za pomocą fuzji genowych z genami reporterowymi *phoA* i *lacZ* określono topologię błonową (tj. układ domen białkowych w błonie cytoplazmatycznej) dwóch kluczowych białek tego systemu transportu: PssT - polimerazy EPS typu Wzy i PssL - flipazy typu Wzx. Skonstruowany przeze mnie mutant z delecją C-końcowej domeny PssT produkował większe ilości egzopolisacharydu oraz wykazywał zaburzoną proporcję frakcji wysoko- i niskocząsteczkowej polimeru w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano, że PssL - flipaza typu Wzx jest odpowiedzialna za translokację oligosacharydów przez błonę cytoplazmatyczną. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano, po raz pierwszy dla gatunku *R. leguminosarum*, model procesu polimeryzacji i transportu egzopolisacharydu na powierzchnię komórki bakteryjnej.

O istotnej roli genów *pss* w adaptacji do symbiotycznego i glebowego środowiska rizobiów świadczą wyniki fenotypowych badań mutantów w tych genach. Wykazano, że mutacje w genach *pss* wywierają plejotropowy efekt na komórki, co znacząco wpływa na funkcjonowanie rizobiów, zarówno w odniesieniu do ich zdolności symbiotycznych jak również wegetatywnego trybu życia w naturalnym środowisku glebowym. Mutanty w genach *pssD*, *pssP*, *pssT* czy *pssO* nie syntetyzujące EPS lub produkujące EPS w zmienionej ilości i stopniu polimeryzacji, zasiedlały jedynie młodsze strefy rozwoju brodawki korzeniowej indukując przy tym większy poziom odpowiedzi stresowej ze strony gospodarza roślinnego. Ponadto mutacje *pss* powodowały zmiany we wrażliwości na detergenty, etanol czy niektóre

antybiotyki, co wskazuje na zaburzenia integralności osłon komórkowych bakterii (**Arch. Microbiol., 2004**).

Opisane powyżej badania pozwoliły na określenie organizacji genomu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1, a poprzez porównania z blisko spokrewnionymi szczepami *Rhizobium*, poziom jego zmienności na tle całego gatunku. Zidentyfikowano i zmapowano regiony genomu RtTA1 istotne dla komórki, jakimi są skupiska genów biosyntezy polisacharydów, co pozwoliło na wyciągnięcie wniosków dotyczących mikroewolucji genomu *Rlt*. Wybrane geny *pss* zbadano na poziomie molekularnym oraz przedstawiono ich funkcję poprzez izolację i analizę mutantów. Wyniki tych badań pozwoliły na opisanie kluczowych elementów systemu eksportu EPS na powierzchnię komórki i wykazanie istotnej roli genów odpowiedzialnych za biosyntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów w adaptacji do zmiennego środowiska życia rizobiów. Dodatkowo dopracowano dla potrzeb modelu doświadczalnego (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*), szereg technik badawczych, a przede wszystkim rozdział całych replikonów rizobiowych w zmiennym polu elektrycznym (PFGE) i hybrydyzację Southerna wykonywaną dla tak rozdzielanego, wysokocząsteczkowego DNA. Umożliwiło to podjęcie kolejnych etapów analizy organizacji i zmienności genomu *Rlt*, które dotyczyły większych obszarów genomu, czyli puli plazmidowego DNA stanowiącego kluczowy element plastyczności genomu i adaptacyjnego potencjału metabolicznego rizobiów.

Cechą charakterystyczną plazmidów rizobiowych jest ich niska liczba kopii w komórkach oraz unikalny wśród bakterii system replikacji, w którym elementy odpowiedzialne za partycję (aktywną segregację) i replikację znajdują się w obrębie jednego operonu, złożonego z genów *repABC*. W toku przeprowadzonych badań zidentyfikowano i zbadano na poziomie molekularnym systemy replikacji wszystkich plazmidów RtTA1 (**Plasmid, 2011**). W każdym z nich zidentyfikowano geny *repABC* kodujące zdolność replikacji i aktywnej segregacji zreplikowanych kopii plazmidów do komórek potomnych oraz elementy związane ze zjawiskiem niezgodności plazmidów, takie jak *inca*. Mimo ogólnego podobieństwa regionów *rep* plazmidów RtTA1 do dotychczas opisanych, wykazywały one także pewien poziom zmienności dotyczący np. obecności i lokalizacji centromero-podobnych sekwencji typu *parS*. Potwierdzono eksperymentalnie, że poszczególne plazmidy RtTA1 należą do różnych grup niezgodności, a wykorzystując elementy *inca* RtTA1, zidentyfikowano także plazmidy z tych samych grup niezgodności w *Rlv* i *Rhe*. Ponadto zaobserwowano, że w RtTA1, *Rlv* i *Rhe* można wyróżnić grupy plazmidów, których systemy replikacji, poza przynależnością do tych samych grup

niezgodności, wykazują znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasowej poszczególnych białek Rep, co sugeruje, że mogą tworzyć szkielet (ang. *framework*) puli pozachromosomalnego DNA wspólny dla gatunków *R. leguminosarum* i *R. etli*. Badania systemów replikacji dostarczyły także cennych informacji dotyczących ewolucji plazmidów. Analiza filogenetyczna wykonana w oparciu o sekwencje białek Rep RtTA1 wykazała, że poszczególne plazmidy tego szczepu mogły zostać nabyte na drodze niezależnych zdarzeń horyzontalnego transferu, któremu towarzyszyła homologiczna rekombinacja, umożliwiającą koegzystencję wielu plazmidów wykorzystujących ten sam system replikacji w jednej komórce. Stwierdzono, że ewolucyjnie "najmłodszym" plazmidem RtTA1 jest plazmid symbiotyczny pRleTA1a. Ponadto systemy replikacji niektórych plazmidów RtTA1 wykazywały podobieństwo do opisanych w innych rizobiach, pozachromosomalnych replikonów, o cechach pośrednich pomiędzy plazmidem i chromosomem. Replikony te nazwano chromidami, ponieważ posiadały typowy dla plazmidów system replikacji i równocześnie zawierały geny ważne lub nawet niezbędne dla przeżywalności komórki. Podobieństwo plazmidów RtTA1 do chromidów oraz fakt, że żaden z nich nie ulegał całkowitej eliminacji z komórki pod wpływem elementów niezgodności dostarczonych *in trans*, pozwala przypuszczać, że przynajmniej niektóre z tych plazmidów mogą mieć cechy tzw. drugorzędowych chromosomów (ang. *secondary chromosomes*).

Wyniki uzyskane w trakcie badań systemów replikacji plazmidów RtTA1 stanowiły punkt wyjścia do analizy zmienności genomu *R. leguminosarum* bv. *trifolii* przeprowadzonej na większej populacji szczepów. Obiektem doświadczalnym była grupa kilkudziesięciu szczepów, wyizolowanych z brodawek koniczyny, która stanowiła reprezentację lokalnej populacji *Rlt* (*Appl. Environ. Microbiol.* 2010 oraz *BMC Microbiol.*, 2011). Wyizolowane szczepy różniły się znacząco organizacją genomu - liczba replikonów pozachromosomalnych wynosiła od 3-6, a ich wielkość od ok. 200 kbp do ponad 1 Mbp. Większość zbadanych szczepów posiadała duży plazmid (>1 Mbp). Zawartość pozachromosomalnego DNA w badanych szczepach wynosiła od 1,89 do 3,25 Mbp, co stanowi odpowiednio od 26 do 45% wielkości genomu. Przeprowadzono analizę zmienności genomu populacji *Rlt* poprzez serie hybrydyzacji Southerna z sondami molekularnymi będącymi markerami poszczególnych replikonów RtTA1. Na podstawie hybrydyzacji z sondami stanowiącymi geny *rep* plazmidów RtTA1, w genomie *Rlt* wyróżniono trzy odrębne przedziały tj. chromosom, replikony o typie chromidu oraz pozostałe plazmidy, do których zaliczono plazmid symbiotyczny, pSym. Mimo dużego zróżnicowania badanych genomów pod względem liczby i wielkości replikonów pozachromosomalnych stwierdzono względną stabilność lokalizacji użytych

markerów na poszczególnych replikonach, zwłaszcza w obrębie chromosomu. Ten wynik jest komplementarny z wykazaną wcześniej syntenią genów w chromosomalnych regionach Pss. Zaobserwowano także wymianę markerów między poszczególnymi częściami genomu, jak również utratę niektórych z nich. Jedynie u dwóch spośród 23 zbadanych szczepów zidentyfikowano wszystkie badane markery, co może świadczyć o pangenomicznej strukturze populacji *Rlt*, w której każdy ze szczepów poza tzw. genomem rdzeniowym posiada zasoby informacji genetycznej specyficzne tylko dla niego samego.

W wybranej puli szczepów *Rlt* częściowo zsekwencjonowano kilkanaście markerów chromosomowych oraz markerów replikonów chromido-podobnych i plazmidowych. Stopień ewolucyjnego dopasowania (*amelioration*) genów zlokalizowanych w różnych przedziałach genomu, mierzony indeksem adaptacji kodonów (CAI, *codon adaptation index*), wykazał niższy poziom adaptacji genów zlokalizowanych w puli plazmidowej obejmujących pSym. Można przypuszczać, że nabyte w trakcie ewolucji plazmidy tego przedziału genomu „spędziły” w nim relatywnie najkrótszy czas. Zaobserwowane różnice, które przekładają się na poziom translacji genów, prawdopodobnie odzwierciedlają równowagę pomiędzy presją selekcyjną a częstością przypadkowych mutacji punktowych w funkcjonalnie zróżnicowanych przedziałach genomowych.

Można zatem stwierdzić, że struktura genomu *Rlt* jest dużo bardziej złożona niż początkowo przypuszczano. Z całą pewnością nie należy traktować zestawu plazmidów *Rlt* jako kryptycznych, które stanowią jedynie zapasowy (a zatem zbywalny, zbędny) genom. W pozachromosomalnym DNA można wyróżnić grupy plazmidów, które są potencjalnie wspólne nie tylko dla szczepów *Rlt*, ale również dla pokrewnych gatunków i są one starsze ewolucyjnie, o czym świadczy ich większy stopień dopasowania do genomu. Niektóre z nich mają cechy chromidów, lub nawet drugorzędowego chromosomu i mogą zawierać geny istotne dla przeżywalności komórki.

Biorąc pod uwagę powyższe dane, m.in. znaczną zawartość plazmidowego DNA stanowiącą nawet 45% wielkości genomu, podjęto badania nad wpływem pozachromosomalnego DNA na potencjał metaboliczny i symbiotyczny rizobiów (*Appl. Environ. Microbiol.*, 2010). Dla grupy reprezentatywnych izolatów *Rlt* różniących się istotnie organizacją genomu (przede wszystkim profilem plazmidowym), przeprowadzono profilowanie metaboliczne z użyciem komercyjnego testu mikroplótkowego Biolog (BIOLOG, Hayward, USA). Zbadano zdolność wykorzystywania różnych źródeł węgla i energii oraz podjęto próbę znalezienia korelacji pomiędzy zmianami w organizacji genomu a potencjałem metabolicznym szczepów. Statystyczna analiza uzyskanych wyników z

zastosowaniem analizy składowych głównych (PCA) wykazała, że większość szczepów charakteryzuje się dużą wszechstronnością metaboliczną, tzn. brakiem szczególnych preferencji w wykorzystywaniu określonych substratów odżywczych. Tylko nieliczne izolaty *Rlt* wykazywały określone preferencje metaboliczne. Zestawiając wyniki tych badań z wynikami opisanymi w pracy *BMC Microbiol.*, 2011, zaobserwowano także, że wśród szczepów wykazujących preferencje metaboliczne były takie, które nie miały dużego replikonu (>1 Mpz). Testy roślinne wykazały, że szczepy wszechstronne metabolicznie charakteryzują się zdolnością do promowania wzrostu roślin na średnim poziomie, podczas gdy szczepy, które mają pewne metaboliczne preferencje są symbiotycznie wysokowydajne. Pozwala to przypuszczać, że czynnikiem, który umożliwia rizobiom przetrwanie w złożonym środowisku i konkurencję z innymi bakteriami, może być także pewien poziom specjalizacji metabolicznej. Przykład odrębnych metabolicznie i symbiotycznie szczepów różniących się wyraźnie profilem plazmidowym wskazuje, że pula pozachromosomalnego DNA odgrywa istotną rolę w dopasowaniu (adaptacji) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do endosymbiotycznego i glebowego środowiska. Postawiono hipotezę, że wśród plazmidów *Rlt* są takie, które można nazwać "clover rhizosphere specific" umożliwiające lepszą adaptację bakterii do gospodarza roślinnego przez dostosowanie metabolizmu mirosymbionta do zasobów ryzosfery określonych gatunków roślin. Uprawniony wydaje się również wniosek, że dla adaptacji i metabolicznego dopasowania rizobiów do określonych warunków środowiskowych niezbędna jest kooperacja wszystkich części genomu: chromosomu i replikonów pozachromosomalnych.

Podsumowując, za najważniejsze wyniki związane z opisanym powyżej nurtem badawczym, zawarte w monotematycznym cyklu 8 oryginalnych prac eksperymentalnych można uznać:

- wykazanie złożonej organizacji genomu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, którego istotną część, obok chromosomu, stanowi zmienna pula pozachromosomalnego DNA wskazująca na pangenomiczną strukturę *R. leguminosarum* biowar *trifolii*. Potwierdza to obecność ewolucyjnie starszych plazmidów (o czym świadczy ich większy stopień dopasowania do genomu), wspólnych dla licznych szczepów *Rlt* oraz plazmidów unikalnych dla indywidualnych szczepów;
- wskazanie możliwej drogi ewolucji genomu *Rlt*, przebiegającej poprzez kolejne zdarzenia horyzontalnego transferu całych plazmidów lub fragmentów DNA, którym towarzyszyły przegrupowania i rearanżacje genomu. Ta plastyczność genomu mogła doprowadzić do nabycia przez plazmidy ważnych lub nawet istotnych genów, a w



konsekwencji do powstania niezbędnych replikonów o charakterze drugorzędowych chromosomów;

- udowodnienie różnego tempa ewolucji poszczególnych przedziałów genomu *Rlt*. Zidentyfikowane regiony biosyntezy powierzchniowych polisacharydów wykazały dużo mniej dynamiczny (w porównaniu do plazmidów) przebieg ewolucji chromosomu, w którym geny zachowują układ i podobieństwo sekwencji;
- wykazanie istotnego znaczenia konserwatywnych i syntenicznych chromosomalnych skupisk genów biosyntezy powierzchniowych polisacharydów w adaptacji do endosymbiotycznego i saprofitycznego stylu życia rizobiów;
- scharakteryzowanie na poziomie molekularnym genów biosyntezy powierzchniowych polisacharydów oraz zaproponowanie modelu translokacji na zewnątrz komórki polimeru EPS, który w dużej mierze decyduje o przeżywalności i infekcyjności rizobiów;
- wskazanie plazmidów jako elementów w istotny sposób kształtujących potencjał metaboliczny, a przez to konkurencyjność rizobiów w środowisku.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w **8 oryginalnych pracach naukowych**. We wszystkich pracach oryginalnych byłem głównym wykonawcą eksperymentów lub wniosłem znaczący wkład, jeśli chodzi o koncepcję badań, analizę wyników i przygotowanie manuskryptów (w **5** pracach byłem autorem korespondencyjnym).

Wyniki własne dyskutowano z wynikami opublikowanymi przez badaczy z wiodących ośrodków w 2 artykułach przeglądowych: *Microb. Cell Fact.*, 2006, *Central European Journal of Biology* 2012, w przygotowaniu których miałem istotny udział (w **1** byłem autorem korespondencyjnym).

Opisane powyżej publikacje, które stanowią główny nurt badań zatytułowanych: „**Organizacja i zmienność genomu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: molekularna analiza regionów genomu istotnych dla adaptacji do endosymbiotycznego i glebowego środowiska**”, były nagradzane:

- wyróżnieniem Komitetu Mikrobiologii PAN przyznawanym w konkursie na najlepsze prace eksperymentalne z zakresu mikrobiologii wykonane w kraju (2004)
- dwukrotnie nagrodą zespołową I stopnia Rektora UMCS (2010 i 2011)

- nagrodą III stopnia Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Genetycznego w konkursie na najlepszą pracę eksperymentalną z zakresu genetyki wykonaną w kraju (2011).

Ponadto w okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moja działalność naukowa została nagrodzona Stypendium Krajowym FNP dla młodych naukowców (rok 2004 z przedłużeniem na rok 2005).

**Znaczącą część przedstawionych powyżej badań wykonano w ramach grantów:**

1. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów *pss* kontrolujących biosyntezę kwaśnego egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” (grant KBN nr 6 P04A 05818, lata 2000-2003, kierownik: prof. dr hab. Anna Skorupska, A. Mazur – wykonawca)
2. „Identyfikacja genu *pssL* i analiza topologii błonowej białka PssL, składnika alternatywnego systemu eksportu egzopolisacharydu w *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1” (grant indywidualny Prorektora UMCS ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą, przyznany na rok 2003)
3. „Genomika funkcjonalna: konstrukcja mapy kontigów megaplazmidu pExo i analiza funkcji genów kontrolujących biosyntezę polisacharydów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*” (grant KBN nr 2 P04A 03426, lata 2003-2006, kierownik: prof. dr hab. Anna Skorupska, A. Mazur – wykonawca)
4. „Genetyczne uwarunkowania adaptacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* do endosymbiotycznego i glebowego środowiska" (grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N301 028734, lata 2008-2011, kierownik: A. Mazur)

## OMÓWIENIE INNYCH PRAC NAUKOWO BADAWCZYCH NIEWLICZANYCH DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

### **1. Badania genów biosyntezy egzopolisacharydu (EPS) *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1**

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem również udział w badaniach genów *pss* w RtTA1, które dotyczyły m.in. analizy ich ekspresji jak również własności i lokalizacji w komórce produktów białkowych wybranych genów *pss*.

- **Analiza ekspresji genów *pss* *R. leguminosarum* bv. *trifolii***

Przeprowadzono analizę poziomu transkrypcji genów *pss* w komórkach bakterii wolnożyjących oraz w bakteroidach w układzie symbiotycznym. Stosując geny reporterowe *lacZ* i *gusA* zaobserwowano, że ekspresja niektórych genów zlokalizowanych w regionie Pss-I (np. *pssTNOP*), a szczególnie *pssO*, w którego regionie promotorowym zidentyfikowano sekwencję regulatorową typu *nod*-box, w rizobiach wolnożyjących może być regulowana przez czynniki środowiskowe, w tym sygnały inicjujące symbiozę (flawonoidy), a w warunkach symbiozy z koniczyną, m.in. przez poziom fosforanów. Złożona regulacja ekspresji genów *pss* wskazuje na istotną rolę EPS zarówno w symbiozie jak i w środowisku glebowym. Wyniki tych badań opisano w pracy:

- Wielbo J., Mazur A., Król J.E., Marczak M., Skorupska A. (2004) Environmental modulation of the *pssTNOP* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 50: 201-11.

- **Analiza funkcji i lokalizacji komórkowej białka PssN *R. leguminosarum* bv. *trifolii***

Scharakteryzowano białko PssN będące kolejnym składnikiem systemu transportu egzopolisacharydu (EPS) w *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (RtTA1). Stwierdzono, że PssN jest lipoproteiną zasocjowaną z błoną zewnętrzną i skierowaną do przestrzeni peryplazmatycznej RtTA1, a nie jak wcześniej przypuszczano poryną, czyli integralnym białkiem tej membrany. Udowodniono, że białko to jest kierowane do błony zewnętrznej przy pomocy N-końcowej sekwencji sygnałnej i może występować w postaci homooligomeru złożonego z co najmniej dwóch podjednostek, w których dominują struktury typu  $\beta$ . Wprowadzenie do komórek RtTA1 dodatkowych kopii genu *pssN* na plazmidzie o szerokim zakresie gospodarza powodowało zwiększenie ilości wydzielanego EPS o ok. 25% w

porównaniu ze szczepem dzikim. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że PssN jest istotnym składnikiem systemu transportu EPS w RtTA1, a właściwości i lokalizacja tego białka wskazują, że pełni ono ważną funkcję jako element łączący komponenty białkowe systemu zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej z błoną zewnętrzną. Wyniki tych badań opisano w pracy:

- Marczak M., **Mazur A.**, Król J.E., Gruszecki W.I., Skorupska A. (2006) Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: subcellular localization and possible involvement in exopolysaccharide export. *J. Bacteriol.* 188, 6943-6952.

Powyższa praca została nagrodzona I Nagrodą Komitetu Mikrobiologii PAN przyznawaną w konkursie na najlepsze prace eksperymentalne z zakresu mikrobiologii wykonane w kraju (rok 2007).

- **Rola białka PssO w biosyntezie egzopolisacharydu *R. leguminosarum* bv. *trifolii***

Prace dotyczące białka PssO stanowiły końcowy etap moich dotychczasowych badań nad biosyntezą egzopolisacharydu w rizobiach. Gen *pssO* jest zlokalizowany w chromosomalnym regionie Pss-I *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (RtTA1). Hipotetyczne białka o wysokim stopniu identyczności z PssO zidentyfikowano *in silico* tylko w genomach *Rlv* i *Rhe*. Mimo braku znaczącego podobieństwa do innych znanych białek bakteryjnych, biorąc pod uwagę lokalizację genu *pssO* w grupie genów *pssT-pssN-pssO-pssP* tworzących opisany system eksportu EPS w RtTA1, stwierdzono, że *pssO* odgrywa ważną rolę w syntezie lub sekrecji EPS. W badaniach molekularnych określono lokalizację subkomórkową, strukturę drugorzędową oraz udział białka PssO w syntezie i/lub wydzielaniu EPS w RtTA1.

Badania te realizowano w ramach interdyscyplinarnego grantu zespołowego Prorektora UMCS d/s Nauki pt.: "Badanie lokalizacji komórkowej, struktury drugorzędowej oraz funkcji białka PssO w syntezie i wydzielaniu egzopolisacharydu przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1", (rok 2007), w którym pełniłem funkcję kierownika.

Białko PssO naprodukowano w *E. coli* jako białko fuzyjne PssO-His<sub>6</sub> i użyto do uzyskania króliczej surowicy anti-PssO. W analizie typu Western z surowicą anti-PssO wykazano, że w *Rlv* i *Rhe* są białka pokrewne immunologicznie z PssO RtTA1, tj. reagujące z surowicą anti-PssO. Surowica anti-PssO reagowała z frakcją białek zewnątrzkomórkowych wytrąconych z supernatantu hodowli płynnej co świadczy o tym, że PssO jest białkiem kierowanym na

zewnątrz komórki i może pozostawać związane z jej powierzchnią. Analiza spektroskopowa typu FTIR wykazała, że w strukturze drugorzędowej PssO dominują  $\alpha$ -helisy (32%), a  $\beta$ -kardki stanowią 12%. Mimo, iż nie określono jednoznacznie funkcji białka PssO, to stwierdzono, że jest ono niezbędne w produkcji EPS przez RtTA1: mutant RtO112 $\Delta$ , w którym gen *pssO* zastąpiono kasetą oporności na antybiotyk, nie wytwarzał EPS. RtO112 $\Delta$ , zakażał komórki gospodarza roślinnego, ale nie był zdolny do wiązania azotu atmosferycznego, co powodowało znaczne zmniejszenie zielonej masy zakażonych roślin. Wyniki tych badań opisano w pracy:

- Marczak M., **Mazur A.**, Gruszecki W., Skorupska A. (2008). PssO, a unique extracellular protein important for exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biochimie* 90: 1781-1790.

Wyniki badań dotyczących biosyntezy powierzchniowych polisacharydów opisano także w trzech pracach przeglądowych:

- Marczak M., **Mazur A.**, Skorupska A. (2003) Bakteryjne systemy transportu cukrów. *Postępy Biochemii* 49: 278-289
- Król J., **Mazur A.**, Skorupska A. (2004) Genomy bakterii symbiotycznych. *Na pograniczu chemii i biologii*. Tom X, red. H. Koroniak i J. Barciszewski, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań.
- Skorupska A., Król J., **Mazur A.**, Marczak M. (2008) Genomika *Rhizobium leguminosarum* – badanie genów syntezy polisacharydów powierzchniowych. *Biotechnologia* 2: 27-40

## **2. Badania różnicowanie genetycznego i metabolicznego lokalnych populacji *Rhizobium leguminosarum***

Uczestniczyłem w badaniach dotyczących różnicowania genetycznego i fenotypowego lokalnych populacji *R. leguminosarum* bv. *viciae* izolowanych z brodawek powstałych na korzeniach wybranej, małej grupy roślin grochu. Badania te realizowano w ramach projektu MNiSW pt. "Genetyczne i fizjologiczne różnicowanie populacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: rola wybranych cech fizjologicznych mikrosymbiontów w kształtowaniu ich własności kompetycyjnych oraz adaptacji do zasiedlania brodawek

korzeniowych grochu” (NN304026734, lata 2008-2011, kierownik: dr Jerzy Wielbo), w którym byłem wykonawcą.

Badaniami objęto blisko 250 izolatów *Rlv* z brodawek grochu. Dla reprezentatywnych grup izolatów oznaczono cechy genetyczne takie jak: profil plazmidowy, sekwencja chromosomowego regionu 16-23S rDNA, sekwencja plazmidowego regionu symbiotycznego *nodA-nodF*, a także fenotypowe: profil metaboliczny, wzrost na podłożach syntetycznych lub zawierających komponenty naturalne takie jak wyciąg glebowy oraz właściwości symbiotyczne, tj. wydajność brodawkowania roślinnego gospodarza oraz symbiotycznego wiązania azotu. Populacja *Rlv* była bardzo zróżnicowana pod względem organizacji genomu, szczególnie w odniesieniu do ilości replikonów pozachromosomalnych. Analiza sekwencji nukleotydowej regionów 16-23S rDNA oraz *nodA-nodF* wykazała, że w obrębie populacji można wyróżnić sub-populacje (klady), często o charakterystycznym profilu metabolicznym (np. preferencyjnie wykorzystujące określone substraty odżywcze). Stwierdzono, że populacje *R. leguminosarum* mogą być złożone ze szczepów należących do różnych linii ewolucyjnych współistniejących w obrębie danego biotypu. Większość szczepów *Rlv* wykazywała relatywnie niską wydajność symbiotyczną, jednak pojedyncze rośliny grochu były zwykle zasiedlane przez kilka różnych szczepów, których sumaryczna aktywność symbiotyczna przyczyniała się do promowania wzrostu roślin. Wyniki tych badań opublikowano w pracach:

- Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., **Mazur A.**, Kubik-Komar A., Skorupska A. (2009) The diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* local population: genetic and physiological traits connection. *Microbiology and Biotechnology (Ukraina)* 3: 40-47.
- Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., **Mazur A.**, Kubik-Komar A., Skorupska A. (2011) The structure and metabolic diversity of population of pea microsymbionts isolated from root nodules. *British Microbiology Research Journal* 1: 55-69.

### 3. Izolacja i analiza molekularna bakteriofagów mezorizobiowych

Brałem udział w badaniach bakteriofagów, zakażających bakterie glebowe z rodzaju *Mesorhizobium* sp. Określona w mikroskopii elektronowej morfologia wyizolowanych fagów pozwoliła zaklasyfikować je do rodzin *Podoviridae* i *Siphoviridae*. Bakteriofagi wykazywały aktywność lityczną jedynie w odniesieniu do szczepów *Mesorhizobium*. W przypadku jednego bakteriofaga stwierdzono, że jego potencjalnym receptorem mogą być elementy lipolisacharydu (LPS) zlokalizowane na powierzchni komórki bakteryjnej. Materiałem

genetycznym badanych bakteriofagów jest DNA, którego profile restrykcyjne różniły się od siebie, mimo podobieństwa morfologicznego. Badania te opisano w pracy:

- Turska-Szewczuk A., Pietras H., Pawelec J., **Mazur A.**, Russa R. (2010) Morphology and general characteristics of bacteriophages infectious to *Robinia pseudoacacia* mesorhizobia. *Curr. Microbiol.* 61: 315-321

#### **4. Molekularna charakterystyka genu lakazy z grzyba tzw. białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor***

W ramach współpracy z Zakładem Biochemii UMCS, brałem udział w badaniach nad identyfikacją i molekularną analizą genu lakazy zidentyfikowanego w genomie grzyba *Cerrena unicolor* powodującego tzw. białą zgniliznę drewna.

Badania te były finansowane z interdyscyplinarnego grantu zespołowego Prorektora UMCS d/s Nauki pt. "Analiza molekularna genu lakazy grzyba białej zgnilizny drewna *Cerrena unicolor*" (rok 2008, kierownik: dr Grzegorz Janusz), w którym byłem wykonawcą.

Skonstruowano bibliotekę cDNA *Cerrena unicolor*, w której zidentyfikowano fragment długości 1533 pz obejmujący gen *lacI*. Komputerowa analiza sekwencji *lacI* wykazała, że dojrzałe białko lakazy składa się z 510 aa i posiada 20 aminokwasowy peptyd sygnałny. W regionie promotorowym genu *lacI* wykryto potencjalne miejsca wiązania licznych czynników transkrypcyjnych, co świadczy o złożonej regulacji ekspresji genu lakazy. Wyniki tych badań opisano w pracy:

- Janusz G., **Mazur A.**, Chęcińska A., Małek W., Rogalski J., Ohga S. (2012) Cloning and characterization of a laccase gene from biotechnologically important basidiomycete *Cerrena unicolor*. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 57: 41-49.

Łączny *impact factor* ww. publikacji dotyczących prac naukowo badawczych nie wliczanych do osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania: **9,964**

Suma punktów za ww. publikacje zgodnie z wykazem MNiSW **138 pkt**

## PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W najbliższej przyszłości zamierzam kontynuować badania dotyczące biologii plazmidów bakteryjnych, mechanizmów ich replikacji i partycji. W chwili obecnej jestem wykonawcą w projekcie finansowanym ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego pt.: "Mutanty *Bradyrhizobium* pozbawione długołańcuchowych hydroksykwasów - wpływ zmiany struktury lipidu A na właściwości fizyko-chemiczne membrany zewnętrznej (OM), zdolność bakterii do brodawkowania i ich przeżywalność wewnątrz komórek eukariotycznych", (N303 822840), przyznany na lata 2011-2013. Moje zadania badawcze w tym projekcie dotyczą konstrukcji mutantów w genie *msbB* odpowiedzialnym za syntezę długołańcuchowych hydroksykwasów.

W przyszłej pracy badawczej planuję analizę sekwencji genomów/transkryptomów bakterii i eukariontów związaną z zakupionym przez Wydział Biologii i Biotechnologii UMCS w ramach Programu Rozwoju Polski Wschodniej 2007-2013, nowoczesnym zestawem aparatury do tzw. wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA (Solid™). Planowane są badania dotyczące genomiki i metagenomiki m.in. mikroorganizmów glebowych. Posiadana aparatura umożliwiła nam przystąpienie do międzynarodowego konsorcjum, którego liderem jest uniQure Biopharma B.V., (Holandia), w ramach którego złożono aplikację (nr rejestracyjny wniosku 7900/9/14866/PS) o fundusze na finansowanie badań dotyczących terapii genowej choroby Huntingtona, ze środków Unii Europejskiej, w ramach programu EUROSTAR.

