

Monika Janczarek

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Autoreferat

Lublin 2011

dr Monika Janczarek
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
mon.jan@poczta.umcs.lublin.pl
tel.: (081) 537-59-74, fax: (081) 537-59-59

ZAŁĄCZNIK 2

AUTOREFERAT

DOŚWIADCZENIE NAUKOWE:

1989-1994	Studia magisterskie na kierunku biotechnologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.
1994 r.	Magister biotechnologii ze specjalnością mikrobiologia. Praca magisterska pt. "Wpływ flawonoidów na wzrost szczepów <i>Rhizobium leguminosarum</i> biowar <i>trifolii</i> i na ekspresję genów <i>nod</i> ".
2001	Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z dnia 10 stycznia 2001 r. Rozprawa doktorska pt. "Identyfikacja genów i ich produktów biorących udział w syntezie zewnątrzkomórkowego polisacharydu <i>Rhizobium leguminosarum</i> biowar <i>trifolii</i> ".

INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

1994-1995	Staż w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
1995-2001	Asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS
od 01.03.2001	Adiunkt w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS

PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ:

Łączny dorobek naukowy obejmuje:

- **20 oryginalnych prac naukowych**, w tym 18 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (sumaryczny *impact factor* - 34,394);
- **5 prac przeglądowych**, w tym 3 w czasopismach z listy JCR (sumaryczny *impact factor* - 6,616);
- **3 referaty** wygłoszone na konferencjach, w tym 1 na konferencji międzynarodowej;

- **38 komunikatów zjazdowych**, w tym 16 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Sumaryczny *impact factor* powyższych prac zgodnie z rokiem ich opublikowania wynosi **41,01**; co odpowiada Pkt_{MNiSW 2010} - **485**, liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS) - **141**; indeks Hirscha (*h*) - **7**.

Po doktoracie opublikowano 18 prac o sumarycznym *impact factor* - **36,637**; Pkt_{MNiSW 2010} - **413**, indeks cytowań_{WoS} - 97, w tym:

- **15 oryginalnych prac naukowych w czasopismach z listy JCR** (sumaryczny *impact factor* - 30,021);
- **3 prace przeglądowe w czasopismach z listy JCR** (sumaryczny *impact factor* - 6,616);
- **3 referaty** wygłoszone na konferencjach, w tym 1 na konferencji międzynarodowej;
- **27 doniesień zjazdowych**, w tym 13 prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl 8 publikacji z lat 2004-2011 przedstawionych pod wspólnym tytułem: „**Rola genu *rosR* w syntezie egzopolisacharydu i symbiozie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną**”, które obejmują 7 oryginalnych publikacji oraz 1 pracę przeglądową (sumaryczny IF prac – **20,817**, Pkt_{MNiSW 2010} – **193**):

1. **Janczarek M.** Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 7898-7933.
IF₂₀₁₀ - **2,279**; Pkt_{MNiSW 2010} – **27**
2. **Janczarek M.**, Skorupska A. The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2007**, 20:867-881.
IF₂₀₀₇ - **4,275**; Pkt_{MNiSW 2010} - **32**
3. **Janczarek M.**[#], Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* gene expression is regulated by catabolic repression. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, 291(1):112-119.
IF₂₀₀₉ - **2,199**; Pkt_{MNiSW 2010} - **20**
4. **Janczarek M.**[#], Skorupska A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12:4132-55.
IF₂₀₁₀ - **2,279**; Pkt_{MNiSW 2010} - **27**

5. **Janczarek M.#**, Kutkowska J., Piersiak T., Skorupska A. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *rosR* is required for interaction with clover, biofilm formation and adaptation to the environment. *BMC Microbiol.* **2010**, 10:284,1-23.
IF₂₀₁₀ - **2,960**; Pkt_{MNiSW 2010} - **27**
6. **Janczarek M.#**, Jaroszuk-Ścisiel J., Skorupska A. Multiple copies of *rosR* and *pssA* genes enhance exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Antonie van Leeuwenhoek* **2009**, 96:471-486.
IF₂₀₀₉ - **1,983**; Pkt_{MNiSW 2010} - **20**
7. **Janczarek M.**, Kalita M., Skorupska A. New taxonomic markers for identification of *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species. *Arch. Microbiol.* **2009**, 191:207-219.
IF₂₀₀₉ - **1,927**; Pkt_{MNiSW 2010} - **20**
8. **Janczarek M.**, Skorupska A. Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *Antonie van Leeuwenhoek* **2004**, 85:217-227.
IF₂₀₀₄ - **2,915**; Pkt_{MNiSW 2010} - **20**
(# autor korespondencyjny)

PRZEBIEG PRACY NAUKOWO-BADAWCZEJ

Studia rozpoczęłam w 1989 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Biologii i Biotechnologii) Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W roku 1994 uzyskałam tytuł magistra biotechnologii ze specjalnością mikrobiologia, a za wyniki w nauce na tym kierunku studiów zostałam wyróżniona nagrodą J. M. Rektora UMCS. Pracę magisterską pt.: „Wpływ flawonoidów na wzrost szczepów *Rhizobium leguminosarum* biowar *trifolii* i na ekspresję genów *nod*” wykonałam w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej pod kierunkiem dr hab. Mieczysławy Deryło. Praca ta dotyczyła wpływu flawonoidów oraz wyciągu korzeniowego koniczyny na wzrost wybranych szczepów symbiotycznej bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i ekspresję genów *nod*, odpowiedzialnych za syntezę cząsteczki sygnałnej - czynnika Nod. Efektem tej pracy było wykazanie, że niektóre flawonoidy, takie jak: apigenina, naryngina i rutyna, równie efektywnie indukowały ekspresję genów *nodABC* jak wyciąg korzeniowy koniczyny, będącej makrosymbiontem dla tego gatunku bakterii. Natomiast inne flawonoidy nie indukowały ekspresji fuzji *nodABC-lacZ* (flawon, hesperetyna, hesperydyna) lub hamowały transkrypcję tych genów (kwercetyna). Wykazano, że biologiczna aktywność tych związków zależy od ich struktury chemicznej, stężenia oraz szczepu bakterii. Ponadto zaobserwowano, że flawonoidy oraz wyciąg korzeniowy koniczyny wpływały na

wzrost bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i wykazano różnice pomiędzy badanymi szczepami. Wyniki badań zawarte w pracy magisterskiej prezentowano na Ogólnopolskim Sympozjum (Kazimierz Dolny, 1994 r.) oraz opublikowano w *Microbiol. Res.* 1997.

W sierpniu 1994 r. zostałam zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie Zakład Genetyki i Mikrobiologii) na etacie asystenta stażysty, a od października 1995 r. na etacie asystenta. Jednym z wiodących tematów badawczych tego zakładu jest zagadnienie przyswajania azotu cząsteczkowego przez bakterie zwane ogólnie rizobiami, w symbiozie z roślinami motylkowatymi. Symbioza ta ma fundamentalne znaczenie dla funkcjonowania biosfery z powodu bardzo dużej ilości azotu atmosferycznego włączanego do puli związków azotowych dostępnych dla roślin. Globalna ilość azotu zredukowanego przez organizmy diazotroficzne stanowi 60% nowo przyswojonego azotu i znacząco przewyższa ilość azotu wprowadzaną do środowiska w postaci nawozów azotowych (25%). Symbiotyczne przyswajanie azotu przez rośliny motylkowate cechuje wysoka wydajność, która wynosi od 100 do 400 kg N/ha/rok w zależności od gatunku rośliny, właściwości zakażającego szczepu oraz warunków środowiska. Chociaż inne bakterie wolno żyjące (np. *Azotobacter* czy *Clostridium*) posiadają również zdolność redukcji azotu cząsteczkowego, jednak proces ten przeprowadzają ze znacznie niższą wydajnością (1 do 3 kg N/ha/rok). Rizobia stanowią bardzo zróżnicowaną grupę bakterii glebowych, które mają zdolność indukowania specyficznych organów, zwanych brodawkami, na korzeniach lub łodygach roślin motylkowatych, wewnątrz których odbywa się proces redukcji azotu atmosferycznego. Po zakażeniu włókników korzeniowych i zasiedleniu brodawek rizobia przekształcają się w specyficzne formy zwane bakteroidami, które redukują azot atmosferyczny do związków azotowych przyswajalnych dla roślin. Symbioza jest procesem wysoce swoistym, co oznacza, że dany gatunek bakterii zakaża określone rośliny motylkowate; np. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* zakaża wyłącznie koniczynę (*Trifolium*), a *Sinorhizobium meliloti* zakaża rośliny z rodzajów *Medicago*, *Melilotus* i *Trigonella*. Na powierzchni komórek rizobiów występują różne polisacharydy, będące integralnym składnikiem ściany (lipopolisacharyd) bądź luźniej z nią zasocjowane (kwaśny i obojętny polisacharyd, kapsularny polisacharyd oraz polisacharyd żelujący), które mają istotne znaczenie dla nawiązania efektywnej symbiozy. Obecność kwaśnego egzopolisacharydu (EPS) jest niezbędna u tych gatunków bakterii, które wchodzą w symbiotyczne interakcje z roślinami motylkowatymi tworzącymi brodawki o trwale funkcjonującym merystemie (np. koniczyna, wyka i lucerna). Rizobia defektywne w syntezie EPS (Exo⁻) są niezdolne do skutecznego zakażenia korzenia gospodarza roślinnego i w konsekwencji do nawiązania efektywnej symbiozy (Fix⁻). EPSy produkowane przez rizobia są gatunkowo swoistymi polimerami, składającymi się z kilkucukrowych podjednostek, które zawierają głównie podstawowe cukry (glukoza,

galaktoza, mannoza, ramnoza, kwas glukuronowy i kwas galakturonowy) i są dodatkowo modyfikowane podstawnikami niecukrowymi (grupy acetylowe, pirogronianowe, bursztynianowe i 3-hydroksymaślanowe). Wyróżnia się dwie frakcje EPS różniące się stopniem polimeryzacji: frakcję o wysokiej masie cząsteczkowej (10^6 - 10^7 Da), która zawiera od setek do tysięcy podjednostek oraz frakcję o niskiej masie cząsteczkowej, która zawiera monomery, dimery i trimery podjednostek. Zaobserwowano duże zróżnicowanie struktury chemicznej EPS rizobiów, które dotyczy składu cukrowego i wielkości podjednostki, rodzaju wiązań glikozydowych oraz podstawników niecukrowych. Na przykład EPS *R. leguminosarum* zawiera ośmiocukrowe podjednostki, składające się z glukozy, kwasu glukuronowego i galaktozy w proporcji 5:2:1, modyfikowane grupami acetylowymi, pirogronianowymi i 3-hydroksymaślanowymi. Natomiast EPS *Bradyrhizobium japonicum* zbudowany jest z pięciocukrowych podjednostek modyfikowanych resztami acetylowymi, w których występuje mannoza, kwas galakturonowy, glukoza i galaktoza, w proporcji 1:1:2:1. EPS pełni różnorodne funkcje w symbiozie: jest składnikiem strukturalnym nici infekcyjnych (specjalnych rurkowatych struktur powstających przez wrastanie ściany i błony komórkowej do wnętrza komórki włośnika), supresorem reakcji obronnej rośliny, zaś jego forma niskocząsteczkowa pełni bardziej swoistą rolę cząsteczki sygnałnej.

Zespół Prof. dr hab. Anny Skorupskiej od wielu lat zajmuje się zagadnieniem genetycznej kontroli syntezy EPS i roli tego polisacharydu w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną czerwoną (*Trifolium pratense*). W 1995 r. dołączyłam do grupy Prof. dr hab. A. Skorupskiej i rozpoczęłam badania związane z identyfikacją i funkcjonalną analizą genów odpowiedzialnych za syntezę EPS wyżej wymienionego gatunku bakterii, które stały się tematem mojej pracy doktorskiej.

DOKTORAT (1995-2001)

Celem pracy doktorskiej była identyfikacja i analiza funkcjonalna regionu DNA *R. leguminosarum* bv. *trifolii* uczestniczącego w syntezie EPS. W ramach tego problemu badawczego zidentyfikowałam region genomu zawierający dwa geny (*pssA* i *pssB*) istotne dla syntezy EPS i regulacji tego procesu u *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. W wyniku przeprowadzonych analiz wyizolowałam z banku genomowego tej bakterii kosmid p2456 komplementujący mutację Exo^- w szczepie Rt74, której efektem fenotypowym było zahamowanie syntezy EPS. Określiłam, że kosmid ten zawiera fragment DNA o wielkości 25 kbp. Przeprowadziłam analizę restrykcyjną wstawki kosmidu p2456, a następnie klonowanie fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu enzymem *EcoRI* na wektor pRK7813 o szerokim zakresie gospodarza. Na podstawie analizy komplementacyjnej z użyciem plazmidów zawierających fragmenty wstawki p2456 o różnej wielkości ustaliłam,

że fragment *EcoRI* o 3,5 kbp posiada zdolność komplementacji mutacji *Exo⁻*. Ponadto, ustaliłam chromosomową lokalizację tego fragmentu DNA oraz jego sekwencję nukleotydową. W regionie tym zidentyfikowałam dwa geny: *pssA* oraz *pssB* i określiłam biologiczne funkcje kodowanych białek. Wykazałam, że gen *pssA* koduje białko o masie 22,3 kDa (200 aa), które zawiera na N-końcu silnie hydrofobową domenę. Białko to jest glukozylo-IP-transferazą uczestniczącą w pierwszym etapie syntezy podjednostki EPS. Natomiast gen *pssB* koduje fosfatazę monofosforanu inozytolu (IMP-azę). Wykorzystując skonstruowany przeze mnie plazmid zawierający kasetę insercyjną wewnątrz genu *pssB*, uzyskałam szczep z mutacją w tym genie, który poddałam szczegółowej analizie genetycznej. Ustaliłam, że mutacja w genie *pssB* powodowała istotne zwiększenie ilości syntetyzowanego EPS (144%) oraz utratę zdolności indukowania efektywnych brodawek na koniczynie (*Fix⁻*), natomiast dodatkowe kopie tego genu znacząco obniżały poziom produkcji EPS (73%). Dane te wskazywały na udział białka PssB w negatywnej regulacji syntezy tego polisacharydu oraz ważną funkcję w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną. Gen *pssB*, położony powyżej genu *pssA*, koduje białko o masie 28 kDa, którego profil hydrofobowości wskazuje na cytoplazmatyczną lokalizację w komórce. W sekwencji aminokwasowej PssB wykryto obecność trzech funkcjonalnych domen, z których domeny 1 i 2 są odpowiedzialne za wiązanie jonów metali, natomiast domena 3 uczestniczy w wiązaniu substratu. Białko PssB *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wykazuje wysoką identyczność sekwencji do PssB u pokrewnej bakterii *R. leguminosarum* bv. *viciae* (97,5%) oraz znacznie niższą identyczność sekwencji do białka CysQ *E. coli* (41,2%), CysQ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (30,5%) oraz do IMP-az pochodzących z roślin i ssaków (~25%). IMP-aza hydrolizuje wiązanie estrowe występujące w fosforanie *myo*-inozytolu, uwalniając *myo*-inozytol oraz P_i . Enzym ten odgrywa kluczową rolę w biosyntezie fosforanów inozytolu oraz fosfolipidów inozytolowych, które uczestniczą w przekazywaniu sygnałów w komórkach eukariotycznych. U bakterii białka homologiczne do IMP-az wykazują plejotropowe funkcje w komórce. W celu potwierdzenia aktywności enzymatycznej PssB *R. leguminosarum* bv. *trifolii* sklonowałam gen *pssB* w wektor ekspresyjny, a następnie otrzymałam rekombinacyjne białko (His)₆PssB, które po oczyszczeniu w warunkach natywnych zostało wykorzystane do oznaczenia jego właściwości katalitycznych oraz do otrzymania przeciwciał poliklonalnych anti-PssB. Przeprowadzone analizy potwierdziły, że PssB posiada aktywność fosfatazy i rozpoznaje szerokie spektrum substratów (najbardziej swoistym substratem jest fosforan *myo*-inozytolu), co jest typową cechą enzymów należących do rodziny IMP-az. Enzym ten wykazywał najwyższą aktywność w pH 7,8 i temperaturze 30°C. Określiłam kinetyczne parametry PssB ($K_m=0,23$ mM, $V_{max}=3,27$ μ mol P_i min⁻¹ (mg białka)⁻¹) oraz wykazałam, że białko to funkcjonuje w formie dimeru i do

swojej aktywności wymaga obecności jonów magnezu (optymalne stężenie wynosiło 3 mM). Natomiast jony litu hamowały aktywność tego enzymu. Wrażliwość na jony Li⁺ została opisana również dla innych IMP-az bakteryjnych oraz eukariotycznych. W dalszych badaniach potwierdziłam występowanie aktywności IMP-azy w szczepie dzikim *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz jej brak w szczepie zawierającym mutację genu *pssB*. Funkcja PssB w symbiozie jest trudna do jednoznacznego określenia. Wydaje się, że białko to najprawdopodobniej uczestniczy w metabolizmie inozytoli, który jest istotny dla przeżywalności i konkurencyjności rizobiów w ryzosferze oraz może pełnić ważną funkcję w adaptacji bakterii do warunków panujących wewnątrz brodawek korzeniowych. Badania innych naukowców potwierdzają, że *myo*-inozytol występuje w brodawkach tworzonych na korzeniach grochu oraz soi i jest składnikiem powszechnie znajdowanym w bakteroidach *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *B. japonicum* wyizolowanych z tych brodawek. Uzyskane przeze mnie wyniki były efektem realizacji zadań w 2 projektach KBN/MNiSW (nr 6 PO4B 014 10: 1996-1999 i nr 6 PO4A 058 18: 2000-2003) oraz były prezentowane na kilku konferencjach w kraju i za granicą. Udział w trzech konferencjach międzynarodowych był możliwy dzięki uzyskaniu przeze mnie stypendiów konferencyjnych (FEMS Young Scientist Grants) w latach: 1996, 1998 i 2000. Wyniki wymienionych badań zostały opublikowane w trzech oryginalnych pracach naukowych (*Bulletin of the Polish Academy of Sciences* 1996, *FEMS Microbiol. Lett.* 1999 i *Arch. Microbiol.* 2001) oraz jednej pracy przeglądowej (*Postępy Mikrobiologii* 1999).

10 stycznia 2001 r. obroniłam pracę doktorską pt.: „Identyfikacja genów i ich produktów biorących udział w syntezie zewnątrzkomórkowego polisacharydu *Rhizobium leguminosarum* biowar *trifolii*”, której promotorem była Prof. dr hab. A. Skorupska. Jeden z recenzentów mojej pracy doktorskiej, Prof. dr hab. Adam Jaworski z Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN i Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego, doceniając wartość poznawczą zawartych w niej wyników, wnioskował o jej nagrodzenie do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS.

BADANIA PROWADZONE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA NAUK BIOLOGICZNYCH (2001-2011)

Wyniki badań stanowiące osiągnięcie naukowe zawarte w monotematycznym cyklu publikacji pod wspólnym tytułem: „Rola genu *rosR* w syntezie egzopolisacharydu i symbiozie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną”.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych zostałam zatrudniona od 1 marca 2001 r. na stanowisku adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS (obecnie

Zakład Genetyki i Mikrobiologii), w którym pracuję do dnia dzisiejszego. W początkowym okresie kontynuowałam badania dotyczące analizy funkcjonalnej genów *pssA* i *pssB* *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, koncentrując się na określeniu ich aktywności transkrypcyjnej w bakteriach wolno żyjących oraz zasiedlających brodawki korzeniowe makrosymbionta, jak również zbadaniu wpływu różnych czynników środowiskowych na ekspresję tych genów w warunkach *ex planta*. Do określenia poziomu ekspresji genów *pssA* i *pssB* w rizobiach bytujących w dwóch odmiennych środowiskach skonstruowałam fuzje transkrypcyjne z bezpromotorowym genem *lacZ* do doświadczeń w warunkach *ex planta* (*pssA-lacZ* i *pssB-lacZ*) oraz z genem *gusA* do badań *in planta* (*pssA-gusA* i *pssB-gusA*). Ustaliłam, że transkrypcja genu *pssA* zachodziła na bardzo niskim poziomie, zarówno w bakteriach wolno żyjących, jak również podczas symbiozy wewnątrz brodawek korzeniowych, wskazując tym samym na ścisłą regulację ekspresji tego kluczowego genu dla syntezy EPS. Natomiast ekspresja genu *pssB* zachodziła na wysokim poziomie w obu testowanych warunkach, potwierdzając istotną rolę białka PssB w adaptacji rizobiów do tych odmiennych nisz ekologicznych. Ponadto wykazałam, że niektóre czynniki środowiskowe (wyciąg korzeniowy koniczyny oraz niedobór źródła fosforu i azotu) wpływały na poziom transkrypcji *pssA* i *pssB*, potwierdzając złożoną regulację ekspresji tych genów. Transkrypcja fuzji *pssA-lacZ* i *pssB-lacZ* wzrastała w obecności fosforanów oraz wyciągu korzeniowego. Natomiast, w obecności jonów amonowych zaobserwowano znaczne obniżenie ekspresji fuzji *pssB-lacZ*. Gen *pssA* zawiera bardzo długi (780 nt) region regulatorowy, w którym zidentyfikowałam dwa motywy stanowiące potencjalne miejsca oddziaływań białek regulatorowych. Pierwszy motyw wykazywał znaczące podobieństwo sekwencji do motywu Ros-box rozpoznawanego przez białko Ros regulujące poziom syntezy EPS u *Agrobacterium tumefaciens*. Natomiast motyw drugi wykazywał istotne podobieństwo sekwencji do kasety PHO box, będącej miejscem oddziaływania białka PhoB, które uczestniczy w regulacji fosforanowej (Antonie van Leeuwenhoek 2004).

Poziom syntezy EPS, struktura jego podjednostki oraz stopień polimeryzacji są bardzo ważne dla funkcji tego polisacharydu w symbiozie. Dane literaturowe dla najlepiej dotychczas zbadanego gatunku rizobiów – *Sinorhizobium meliloti* wskazywały, że synteza EPS podlega złożonej regulacji z udziałem wielu białek regulatorowych oraz różnych sygnałów środowiskowych. *R. leguminosarum* cechuje się dużą odmiennością w stosunku do *S. meliloti*, a dane na temat syntezy EPS i regulacji tego procesu były poznane u tego gatunku bakterii tylko fragmentarycznie. Dlatego postanowiłam zająć się bardziej szczegółowo tym problemem. Swoje zainteresowania naukowe skierowałam na identyfikację kluczowych genów *R. leguminosarum* kodujących białka odpowiedzialne za nadrzędną regulację syntezy EPS oraz wykrycie czynników środowiskowych, które

wpływają na poziom syntezy tego polisacharydu. Analizy genetyczne utrudniał brak sekwencji genomu tego gatunku bakterii. Genom *R. leguminosarum* został zsekwencjonowany dopiero w 2006 roku (Young i wsp. 2006). Pierwsze z wytypowanych przeze mnie do analizy genów, które kodowały białka homologiczne do opisanych już regulatorów syntezy EPS u innych gatunków rizobiów (jak np. gen homologiczny do *exoR* *S. meliloti*) okazały się nie pełnić tak istotnej roli w *R. leguminosarum*.

Kolejnym kandydatem do roli genu kodującego nadrzędny regulator syntezy EPS był gen homologiczny do *rosR* *Rhizobium etli* - gatunku pokrewnego do *R. leguminosarum*. Gen ten odgrywał istotną rolę w konkurencyjności tych bakterii podczas interakcji z jego gospodarzem roślinnym - fasolą (*Phaseolus* sp.). Szczep zawierający mutację w *rosR* był znacznie mniej konkurencyjny w zakażaniu rośliny od szczepu dzikiego, stąd gen ten został nazwany „czynnikiem konkurencyjności” (determinant of competitiveness). Dane te stały się dla mnie inspiracją do poszukiwania genu homologicznego do *rosR* *R. etli* w genomie *R. leguminosarum* i zbadania, czy ma on wpływ na syntezę EPS. Dzięki uprzejmości Prof. J. Handelsmana (University of Wisconsin-Madison, USA) otrzymałam zestaw szczepów i konstruktyw plazmidowych, które posłużyły mi do identyfikacji tego genu. Na podstawie sekwencji nukleotydowej *rosR* *R. etli* zaprojektowane zostały startery do reakcji PCR. Uzyskałam sekwencję *rosR* dla dwóch szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, a ponieważ gen ten wykazywał bardzo wysoki poziom konserwatywności sekwencji, dalsze badania były prowadzone głównie na szczepie Rt24.2. Na podstawie analizy sekwencyjnej ustalono, że *rosR* koduje białko cytoplazmatyczne o masie 15,7 kDa (143 aa), które wykazuje znaczące podobieństwo sekwencji do białek biorących udział w regulacji syntezy EPS u pokrewnych gatunków bakterii, takich jak: RosR *R. etli* (98% identyczności), Ros *A. tumefaciens* (80%), RosAR *Agrobacterium radiobacter* (80%) i MucR *S. meliloti* (80%). Wymienione białka należą do rodziny transkrypcyjnych regulatorów, które zawierają na C-końcu domenę wiążącą DNA o strukturze palca cynkowego C₂H₂. W RosR *R. leguminosarum* bv. *trifolii* domena ta zawiera 19 aminokwasów (region białka: 79 - 97 aa) o sekwencji C-N₂-C-N₉-H-N₃-H-H, w której 2 konserwatywne cysteiny i 2 histydyny wiążą jeden atom cynku, tworząc strukturę palca cynkowego. Poniżej otwartej ramki odczytu *rosR* wykryto obecność terminatora transkrypcji niezależnego od białka Rho. Sekwencja ta o długości 39 nukleotydów zawiera 12-nt odwrócone powtórzenia, które tworzą stabilną strukturę typu „szpilki do włosów” ($\Delta G = -20,3$ kcal) (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007).

W celu określenia, czy białko RosR jest faktycznie zaangażowane w regulację syntezy EPS *R. leguminosarum*, przeprowadziłam ukierunkowaną mutagenezę szczepu Rt24.2 i uzyskałam szczepy zawierające mutację genu *rosR* w regionie promotorowym

(mutant Rt2441) oraz w obrębie jego otwartej ramki odczytu (mutanty Rt2440 i Rt2472). Dla obu rodzajów mutantów *rosR* zaobserwowano bardzo podobne zmiany fenotypowe. Przeprowadzone przeze mnie analizy tych szczepów potwierdziły, że *rosR* pełni bardzo ważną rolę w syntezie EPS *R. leguminosarum*. Szczepy zawierające mutację genu *rosR* produkowały 3-krotnie mniej EPS od szczepu dzikiego, a dodatkowe kopie tego genu wprowadzone na plazmidzie do szczepu dzikiego powodowały prawie 2-krotny wzrost syntezy EPS. Ponadto, EPS produkowany przez mutanty *rosR* zawierał znacznie mniejszą ilość frakcji niskocząsteczkowej, która pełni w symbiozie bardzo ważną rolę cząsteczki sygnałnej, co wskazuje, że białko RosR wpływa nie tylko na poziom syntezy EPS, ale również na stopień jego polimeryzacji. Mutacja genu *rosR* powodowała dodatkowo wiele innych zmian fenotypowych, takich jak: zmiany ilościowe w składzie cukrowym części O-swoistej LPS, zmiany w profilach białek błonowych i zewnątrzkomórkowych, zwiększona wrażliwość na niektóre antybiotyki (karbenicylina, ampicylina i polimyksyna B), detergenty (SDS i DOC), związki osmotycznie czynne oraz czynniki stresowe (NaCl, Na₃PO₄, (NH₄)₂SO₄ i NaNO₃), co wskazywało na zmiany w błonie bakteryjnej. We frakcji białek błonowych mutantu *rosR* (Rt2472) wykazano większe ilości białek o masie ~30 i ~63 kDa, natomiast istotnie mniejszą ilość białek o masie ~20, ~34 i ~36 kDa, w porównaniu do frakcji białek błonowych szczepu dzikiego. Masa ostatnich trzech białek była zbliżona do masy białek: RopB1 (20,1 kDa), RopA (36 kDa) i RopA1 (38 kDa), które zostały opisane wcześniej u *R. leguminosarum* przez Roest i wsp. (1995). Spośród białek, dla których zaobserwowano różnice ilościowe pomiędzy frakcjami mutantu *rosR* i szczepu dzikiego, zidentyfikowałam białko o masie 20 kDa jako RopB1 (na podstawie sekwencji 15 aminokwasów od N-końca). RopB1 jest białkiem błony zewnętrznej, które wykazuje 100% identyczność sekwencji w obrębie analizowanego fragmentu (25-39 aa) do białka OmpA *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 oraz RopB1 *R. etli*.

Analiza porównawcza frakcji białek zewnątrzkomórkowych mutantu *rosR* i szczepu dzikiego również wykazała znaczne różnice. Wśród najistotniejszych zmian należy wymienić obecność dwóch białek o masach ~13 i ~83 kDa we frakcji białek wyizolowanych z supernatantu pochodzącego od mutantu, których nie wykazano we frakcji białek szczepu dzikiego. Sugerowało to niespecyficzny wpływ pewnych białek przez błonę bakteryjną, prawdopodobnie spowodowany zmianami w przepuszczalności błony, które były efektem mutacji genu *rosR*. Z drugiej strony, we frakcji białek zewnątrzkomórkowych mutantu nie wykryto obecności białek o masie ~36 kDa, które występowały w dużej ilości w supernatancie szczepu dzikiego, co sugeruje zaburzone działanie w tym szczepie systemu transportu PrsDE typu I.

Bakterie zawierające mutację genu *rosR* charakteryzowały się również zmienioną morfologią kolonii na podłożu stałym, rosły znacznie wolniej od szczepu dzikiego i wykorzystywały mniejszą liczbę związków jako źródło węgla i azotu. Spośród testowanych związków jako źródło węgla (190 związków), azotu (95), fosforu (59) i siarki (35), wykazano, że mutant Rt2472 nie wykorzystywał 9 związków jako źródła węgla i 12 jako źródła azotu, a wiele pozostałych składników było wykorzystywanych ze znacznie niższą wydajnością w porównaniu do szczepu dzikiego. Ponadto, mutanty *rosR* charakteryzowały się obniżoną ruchliwością i adhezją do powierzchni korzeni roślin, a także tworzyły znacznie mniej biofilmu (od 37% do 45% w zależności od rodzaju mutantu *rosR*), który różnił się istotnie pod względem takich parametrów, jak: organizacja, grubość i żywotność komórek, od biofilmu tworzonego przez szczep dziki. Efektem mutacji wpływającym w bardzo istotnym stopniu na przebieg symbiozy była bardzo znacznie obniżona zdolność kolonizacji włóśników korzeniowych, która jest etapem niezbędnym dla prawidłowej infekcji korzenia rośliny. W doświadczeniach roślinnych z użyciem szczepów wyznakowanych plazmidem pHC60, który zawierał gen *gfp* kodujący białko o zielonej fluorescencji zaobserwowano, że komórki mutantu *rosR* przylegały do włóśników korzeniowych koniczyny z niewielką częstością i dużym opóźnieniem w porównaniu do szczepu dzikiego. Ponadto, włóśniki korzeniowe miały nietypowy, rozdęty kształt, a nici infekcyjne były tworzone w nich jedynie sporadycznie. W efekcie tego, mutanty *rosR* indukowały dużo mniejszą liczbę brodawek, które pojawiały się ze znacznym opóźnieniem w porównaniu do brodawek indukowanych przez szczep dziki i były one niezdolne do wiązania azotu (Fix⁻). Wykazano także bardzo istotnie obniżoną konkurencyjność bakterii posiadających mutację tego genu. Zaobserwowane zmiany fenotypowe mutantów *rosR* wskazują, że produkt tego genu jest niezbędny, nie tylko dla optymalnego poziomu syntezy EPS, ale pełni bardziej ogólną funkcję w komórce, istotną dla adaptacji bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych panujących w glebie oraz w interakcji z gospodarzem roślinnym (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, *BMC Microbiol.* 2010).

Powyższe dane skłoniły mnie do podjęcia dalszych badań nad rolą genu *rosR* i EPS w symbiozie. Do tych analiz dołączyłam *pssA*, który jest kluczowym genem w procesie syntezy tego polisacharydu. Dla zbadania wpływu dodatkowych kopii genów *rosR* i *pssA* oraz sprawdzenia czy obserwowane efekty mają uniwersalny charakter i występują w różnych szczepach należących do gatunku *R. leguminosarum*, zastosowałam szczepy będące pochodnymi Rt24.2 oraz kilku wybranych izolatów pochodzących z brodawek koniczyny, które zawierały te geny na plazmidzie pBBR1MCS. Wykazałam, że obecność genów *rosR* i *pssA* w dodatkowej liczbie kopii (6-7 kopii plazmidu/komórkę) powoduje znaczny wzrost ilości produkowanego EPS we wszystkich badanych szczepach (w przypadku *pssA* wynosił on średnio 1,7-razy, a dla *rosR* prawie 2

razy). Ponadto wykazałam, że dodatkowe kopie tych genów wpływają pozytywnie również na własności symbiotyczne bakterii, przyczyniając się do zwiększenia liczby brodawek indukowanych na korzeniach koniczyny, znaczącego wzrostu konkurencyjności w zasiedlaniu brodawek oraz wzrostu liczby bakterii zasiedlających daną brodawkę, co w konsekwencji prowadziło do zwiększenia efektywności symbiozy, objawiającej się zwiększeniem masy części nadziemnej roślin. Wykazano, że szczepy zawierające dodatkowe kopie genów *rosR* i *pssA* zasiedlały o 23% do 56% więcej brodawek w porównaniu ze szczepami typu dzikiego. Ponadto, brodawki indukowane przez szczepy z dodatkowymi kopiami tych genów były zasiedlone przez 10-krotnie większą liczbę bakterii niż brodawki indukowane przez szczepy niezmodyfikowane. Uzyskane wyniki potwierdzają istotną rolę EPS we wczesnych etapach symbiozy i wskazują, że większa ilość polisacharydu syntetyzowana przez rizobia zapewnia im lepszą adaptację do warunków glebowych oraz większą konkurencyjność w zasiedlaniu korzenia makrosymbionta. Polepszenie własności symbiotycznych było obserwowane u wszystkich zmodyfikowanych szczepów, a w szczególności w szczepach zawierających dodatkowe kopie genu *rosR*. Dodatkowo, w wyniku ukierunkowanej mutagenyzy szczepu Rt24.2 uzyskałam mutanta w genie *pssA*, który został dołączony wraz z mutantem *rosR* do tych badań. Wykazałam, że szczep posiadający mutację w genie *pssA* nie produkował EPS i indukował 3-krotnie mniejszą liczbę brodawek na koniczynie od szczepu dzikiego, które były jedynie w niewielkim stopniu zasiedlone przez bakterie. Również mutant w genie *rosR* indukował 2 razy mniej brodawek, w których występowało 10-krotnie mniej bakterii niż w brodawkach indukowanych przez szczep dziki. Dane te potwierdzają istotną rolę genów *rosR* i *pssA* w syntezie EPS i symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną (Antonie van Leeuwenhoek 2009). Powyższe wyniki były prezentowane na IV Międzynarodowej Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin w Krakowie w 2009 r., na której poster pt.: „*rosR* and *pssA* are involved in exopolysaccharide production, symbiotic competitiveness and clover nodulation in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains” został nagrodzony przez organizatorów w konkursie na najlepsze prezentacje posterowe.

Kolejne analizy dotyczące *rosR* i *pssA* wykazały, że geny te stanowią niezależne jednostki transkrypcyjne i występują w pojedynczych kopiach w genomach szczepów należących do trzech biowarów gatunku *R. leguminosarum*: bv. *trifolii*, *viciae* i *phaseoli*. Dla kilku wybranych izolatów, będących przedstawicielami każdego biowaru przeprowadzona została analiza filogenetyczna w oparciu o sekwencje tych genów oraz genu 16S rRNA, która potwierdziła wysoką konserwatywność ich sekwencji nukleotydowych. Wykazano, że sekwencje kodujące genu *rosR* tych izolatów były w 99,3%-99,7% identyczne z sekwencją genu *rosR* szczepu Rt24.2. Podobnie dla genu

pssA zaobserwowano bardzo wysoką identyczność sekwencji, która wynosiła od 99,1% do 99,5% dla poszczególnych izolatów w porównaniu do szczepu Rt24.2. Natomiast większe zróżnicowanie sekwencji wykryto w regionach regulatorowych genów *rosR* i *pssA*. Dane te zostały wykorzystane przeze mnie do opracowania szybkiej i specyficznej metody identyfikacji izolatów należących do gatunku *R. leguminosarum*, odróżniania ich od innych blisko spokrewnionych gatunków bakterii, a następnie przyporządkowania do poszczególnych biowarów *R. leguminosarum*. Metoda ta wykorzystuje 3 reakcje duplex-PCR i 7 zestawów starterów zaprojektowanych na podstawie sekwencji genów: *rosR*, *pssA*, *pssY*, *psiA* oraz *regA-mgl2*. Wykazana skuteczność tej metody wskazuje, że geny *rosR* i *pssA*, na których sekwencji opiera się w większości ta analiza, mogą zostać uznane za nowe markery przydatne w identyfikacji i analizie pokrewieństwa filogenetycznego w obrębie szczepów należących do *R. leguminosarum*. Ponadto, metoda ta może być wykorzystana do selekcji rizobiów uzyskanych w wyniku izolacji bakterii z gleby lub brodawek korzeniowych (Arch. Microbiol. 2009). Podczas realizacji tego zadania badawczego uzyskałam 50 sekwencji nukleotydowych wymienionych genów z różnych szczepów *R. leguminosarum*, które zostały zdeponowane w bazie GenBank.

Równolegle do opisanych powyżej analiz kontynuowałam badania dotyczące dalszej charakterystyki genu *rosR*. W pierwszym etapie pracy wykonałam analizę *in silico* sekwencji nukleotydowej regionu promotorowego *rosR* w celu identyfikacji motywów potencjalnie zaangażowanych w regulacji transkrypcji tego genu. Do analizy wykorzystane zostały sekwencje konsensusowe rozpoznawane przez różne białka regulatorowe, które reagują na zmieniający się poziom określonych czynników środowiskowych, takich jak np. fosforany, flawonoidy czy rodzaj źródła węgla. Wstępne analizy wykazały, że gen *rosR* zawiera długi region regulatorowy (450 nt) poprzedzający jego otwartą ramkę odczytu, w którym zidentyfikowano kilka sekwencji palindromowych oraz motywów stanowiących potencjalne miejsca oddziaływań białek regulatorowych. Dla potwierdzenia rzeczywistej funkcji tych sekwencji w regulacji ekspresji genu *rosR* skonstruowałam zestaw 23 fuzji *rosR-lacZ* zawierających fragmenty regionu regulatorowego o różnej wielkości sklonowane na niskokopijnym plazmidzie pMP220. Dla tych konstruktyw określony został poziom aktywności β -galaktozydazy w tle genetycznym *Escherichia coli* oraz *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w obecności różnych związków chemicznych. W oparciu o wyniki tych analiz ustaliłam, że gen *rosR* zawiera dwa promotory, z których dystalny promotor P1 (5'-TTGGCG-N₁₇-TATTTG-3') wyróżnia się bardzo wysoką aktywnością w porównaniu z innymi dotychczas scharakteryzowanymi promotorami genów *R. leguminosarum*, podczas gdy proksymalny promotor P2 (5'-ATGCAA-N₂₀-TACAAT-3') wykazuje bardzo słabą aktywność. Wykazałam również, że syntetyzowane są dwa transkrypty *rosR* o różnej długości i wyznaczyłam dla nich miejsca

startu transkrypcji. Heksamery -35 i -10 zidentyfikowane w promotorze P1 przypominały swoją sekwencją i wewnętrzną organizacją promotory Eubakterii rozpoznawane przez podjednostkę σ_{70} polimerazy RNA. Wykazałam, że za wyjątkową siłę promotora P1 odpowiedzialne są dwa dodatkowe motywy zlokalizowane w jego regionie: element UP obecny przed heksamerem -35 oraz sekwencja „TGN extended -10” przed heksamerem -10, które odgrywają istotną rolę w inicjacji transkrypcji genu *rosR*. Te elementy regulatorowe wykrywane są w promotorach jedynie nielicznych genów bakteryjnych i jest to prawdopodobnie pierwszy opisany przykład promotora genu o takiej organizacji w rizobiach (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, *FEMS Microbiol. Lett.* 2009). Ponadto, w regionie regulatorowym *rosR* wykryłam obecność 6 motywów zawierających odwrócone powtórzenia (IR - inverted repeats) o różnej długości sekwencji, spośród których motyw IR5 wyróżniał się najdłuższą, 12-nt sekwencją. Analiza *in silico* struktur drugorzędowych RNA dwóch transkryptów *rosR* wykazała, że sekwencje końca 5' odgrywają istotną rolę w stabilizacji tych struktur, a motyw IR5 pełni w tym procesie zasadniczą rolę (*Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4132-4155). Zamierzam kontynuować te badania w celu określenia roli pozostałych motywów IR w stabilizacji struktur drugorzędowych RNA i ekspresji *rosR* z udziałem białek regulatorowych. Nawiązana w ostatnim czasie współpraca z zespołem Prof. dr hab. J. Bujnickiego z Laboratorium Bioinformatyki i Inżynierii Białek w Warszawie może przyczynić się do bardziej szczegółowej charakterystyki tych struktur.

W kolejnych latach pracy przeprowadziłam badania, które miały na celu potwierdzenie biologicznej funkcji motywów zidentyfikowanych w regionie regulatorowym *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* jako miejsc oddziaływań określonych białek regulatorowych. Spośród tych motywów, sekwencja RosR-box o długości 22 nt i zawierająca 9-nt odwrócone powtórzenia (CGGAATCTA-G₄-TGGATTTCG) okazała się być kluczowa w regulacji ekspresji genu *rosR*. Motyw ten wykazuje bardzo wysoką identyczność sekwencji do kaset Ros-box zlokalizowanych w promotorach genów homologicznych do *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* u pokrewnych gatunków bakterii, takich jak: *rosR* *R. etli*, *rosAR* *A. radiobacter* i *ros* *A. tumefaciens*. W celu potwierdzenia udziału białka RosR w regulacji transkrypcji *rosR*, sklonowałam ten gen w wektor ekspresyjny i otrzymałam białko rekombinacyjne (His)₆RosR, które zostało oczyszczone w warunkach natywnych. W doświadczeniach EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) z użyciem (His)₆RosR wykazałam, że białko to funkcjonuje w formie dimeru i efektywnie wiąże się do motywu RosR-box zlokalizowanego w promotorze genu *rosR* *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Zaobserwowałam również, że RosR hamuje transkrypcję własnego genu (autoregulacja), natomiast pozytywnie wpływa na ekspresję genu *pssA*, w którego regionie promotorowym zidentyfikowałam wcześniej motyw o wysokim podobieństwie sekwencji do kasety Ros-box (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, Antonie

van Leeuwenhoek 2004). W regionie regulatorowym *rosR* wykryte zostały również 3 motywy wykazujące istotne podobieństwo sekwencji do motywu TGTGA-N₆-TCACA rozpoznawanego przez kompleks cAMP-CRP u *E. coli*, które wskazywały na represję kataboliczną transkrypcji tego genu. W obecności glukozy zaobserwowano obniżenie ekspresji *rosR*, natomiast nie wykazano takiej regulacji w szczepach *E. coli* zawierających mutację genu *crp* oraz genu *cyaA* kodującego cyklazę adenylową (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007). Ustaliłam, że motywy 1 i 2 są niezbędne dla optymalnej ekspresji *rosR* kierowanej z głównego promotora P1, podczas gdy motyw 3 uczestniczy w transkrypcji tego genu z udziałem promotora P2. Położenie motywów cAMP-CRP 1 i 2 powyżej miejsca startu transkrypcji TS1 wskazuje, że CRP-zależna aktywacja transkrypcji *rosR* z promotora P1 zachodzi najprawdopodobniej według modelu opisanego u *E. coli* (synergistic class III mechanism), w którym są zaangażowane dwa lub więcej dimerów białka CRP albo CRP i innych białek aktywatorowych. Położenie motywu cAMP-CRP 3 pomiędzy heksamerami -35 a -10 P2 sugeruje, że promotor ten jest aktywowany zgodnie z mechanizmem działania promotora CRP-zależnego klasy II u *E. coli*. W tej klasie promotorów, białko CRP wiąże się do sekwencji zlokalizowanej w pobliżu heksameru -35 i za pośrednictwem 2 domen (AR1 i AR2) oddziałuje z polimerazą RNA. Ponadto wykazano, że *R. leguminosarum* bv. *trifolii* produkuje znacznie więcej EPS w obecności glicerolu niż w obecności glukozy, co wskazuje na regulację tego procesu za pośrednictwem białka RosR (*FEMS Microbiol. Lett.* 2009).

W kolejnych doświadczeniach potwierdziłam funkcję motywów LysR, PHO box oraz IR4 w regulacji ekspresji genu *rosR*. Motyw LysR [(T-N₁₁-A)₃], położony w pobliżu kasety RosR-box, jest rozpoznawany przez białko NodD, będące m. in. aktywatorem ekspresji genów *nod*, które w obecności wyciągu korzeniowego koniczyny zwiększa ekspresję *rosR*. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazywały również, że stężenie fosforanów ma wpływ na ekspresję genu *rosR* i regulacja ta zachodzi za pośrednictwem motywów o znaczącym podobieństwie sekwencji do kasety PHO box (CTGTCAT-N₄-CTGTCAT) rozpoznawanej przez białko PhoB o funkcji pozytywnego regulatora. W szczepie *E. coli* zawierającym mutację genu *phoB* zaobserwowano niższy poziom transkrypcji fuzji *rosR-lacZ* w porównaniu do szczepu dzikiego, co potwierdza udział tego białka aktywatorowego w regulacji ekspresji *rosR*. Kolejny motyw, IR4 (GATTGT-N₅-ACAATC) zawierający 6-nukleotydowe odwrócone powtórzenia zlokalizowano nieznacznie poniżej promotora P1 i pierwszego miejsca startu transkrypcji TS1. Wykazano, że motyw ten częściowo pokrywa się z heksamerem -10 promotora P2. W wyniku przeprowadzonej mutagenyzy poszczególnych nukleotydów w obrębie pierwszej i drugiej części motywu IR4 ustalono, że sekwencja ta uczestniczy w negatywnej regulacji transkrypcji *rosR* i jest rozpoznawana przez specyficzne białko rizobiowe, ponieważ takiej

represji nie wykazano w tle genetycznym *E. coli*. Natomiast sekwencja -10 P2 jest niezbędna dla optymalnego poziomu transkrypcji *rosR*, gdyż mutacja tego miejsca powodowała 4-krotne obniżenie ekspresji fuzji *rosR-lacZ* (*Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4132-4155). W pracy tej wykazałam ponadto, że obecność wyciągu korzeniowego koniczyny oraz niedobór fosforanów powoduje wzrost syntezy EPS oraz ilości tworzonego biofilmu przez szczep dziki *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 24.2 oraz jego pochodną zawierającą dodatkowe kopie genu *rosR*. Te czynniki środowiskowe wpływają również w istotnym stopniu na takie parametry symbiotyczne, jak: liczba brodawek tworzonych na korzeniach koniczyny, liczba bakterii zasiedlających brodawki oraz masa części nadziemnej roślin. Zaobserwowano, że optymalnym stężeniem fosforanów dla przebiegu symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną jest 1,5 mM. Natomiast niedobór, jak również nadmiar fosforanów wpływa negatywnie na wszystkie parametry symbiotyczne. Ponadto wykazano, że inkubacja bakterii w obecności wyciągu korzeniowego koniczyny przed wprowadzeniem ich na korzenie roślin wpływa bardzo korzystnie na symbiozę, przyczyniając się do znacznego wzrostu ilości bakterii zasiedlających brodawki oraz liczby brodawek indukowanych na korzeniach koniczyny (*Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4132-4155).

Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że regulacja transkrypcji genu *rosR* jest bardzo złożona, w której potwierdzono udział czterech białek regulatorowych (RosR, CRP, NodD i PhoB). Białka te (z wyjątkiem RosR) uczestniczą w regulacji ekspresji tego genu w odpowiedzi na takie czynniki środowiskowe, jak: źródło węgla, wyciąg korzeniowy koniczyny oraz fosforany. W obecności wyciągu korzeniowego, niskich stężeń fosforanów oraz przy braku glukozy zaobserwowano zwiększoną ekspresję *rosR* oraz wyższy poziom produkcji EPS. Bardzo ważnym miejscem docelowym białka RosR jest gen *pssA*. W mutancie *rosR* transkrypcja *pssA* jest prawie 2-krotnie niższa niż w szczepie dzikim, co wskazuje na pozytywny wpływ RosR na ekspresję tego kluczowego dla syntezy EPS genu (*Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, *Int. J. Mol. Sci.* 2011). W dalszej pracy zamierzam kontynuować badania mające na celu wyjaśnienie, czy produkt genu *rosR* wpływa na ekspresję innych genów *R. leguminosarum* związanych z syntezą EPS. Obecnie kontynuowane są badania dotyczące analizy mikroskopowej brodawek indukowanych przez mutantą *rosR* we współpracy z Katedrą Botaniki SGGW w Warszawie. Dodatkowo, prowadzone są również doświadczenia dotyczące biofilmów tworzonych przez mutanty w genie *rosR* i *pssA* oraz szczepy zawierające dodatkowe kopie tych genów, a ich analizy mikroskopowe wykonywane są we współpracy z Zakładem Biochemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Uzyskane przeze mnie wyniki dotyczące roli EPS i genu *rosR* w regulacji syntezy tego ważnego symbiotycznie polisacharydu mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów interakcji zachodzących podczas symbiozy rizobiów z roślinami motylkowatymi i efektywniejszego wykorzystania tych bakterii w rolnictwie.

Praca przeglądowa pt.: "Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia" (*Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 7898-7933) stanowi podsumowanie moich wieloletnich badań dotyczących charakterystyki genu *rosR* i funkcji kodowanego przez niego białka w regulacji syntezy EPS oraz w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną, w kontekście wyników uzyskanych przez wiodące ośrodki naukowe, obejmujących produkcję EPS przez różne gatunki rizobiów oraz wpływ czynników środowiskowych na regulację tego procesu.

Podsumowanie najważniejszych wyników, które stanowią osiągnięcie naukowe dotyczące roli genu *rosR* w syntezie egzopolisacharydu i symbiozie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną:

- Identyfikacja genu *rosR* kodującego pozytywny regulator syntezy EPS w genomie *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.
- Wykazanie, że ekspresja *rosR* odbywa się z dwóch promotorów: dystalnego promotora P1 o wysokiej aktywności i proksymalnego promotora P2 o bardzo niskiej aktywności. *rosR* jest transkrybowany na bardzo wysokim poziomie i za ten efekt odpowiedzialny jest promotor P1 zawierający oprócz sekwencji -35 i -10, dodatkowo dwa unikalne elementy, które uczestniczą w inicjacji transkrypcji tego genu: element UP oraz „TGN extended -10”.
- Wykazanie, że syntetyzowane są dwa transkrypty *rosR* o różnej długości, dla których ustalono miejsca startu transkrypcji. W stabilizacji struktur drugorzędowych RNA biorą udział motywy IR zawierające sekwencje palindromowe, z których motyw IR5 wyróżnia się najbardziej istotną funkcją.
- Wykazanie, że białko RosR jest czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym domenę wiążącą DNA o strukturze C₂H₂. RosR negatywnie reguluje transkrypcję własnego genu poprzez wiązanie się do motywu RosR-box zlokalizowanego w regionie regulatorowym *rosR* (autoregulacja). Natomiast białko to wpływa pozytywnie na transkrypcję *pssA* kodującego kluczowy enzym w syntezie EPS (glukozylo-IP-transferazę).
- Wykazanie, że czynniki środowiskowe, takie jak: fosforany, rodzaj źródła węgla oraz flawonoidy zawarte w wyciągu korzeniowym koniczyny wpływają na poziom transkrypcji *rosR* i syntezy EPS oraz ilości tworzonego biofilmu przez *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

- Wykazanie, że regulacja transkrypcji *rosR* jest bardzo złożona, w której potwierdzono udział kilku białek regulatorowych oraz motywów wykrytych w regionie promotorowym tego genu:
 - 1) Motyw LysR rozpoznawany przez białko NodD w obecności flawonoidów;
 - 2) Motywy cAMP-CRP rozpoznawane przez kompleks cAMP-CRP przy braku glukozy;
 - 3) Motywy PHO box rozpoznawane przez białko PhoB w warunkach niedoboru fosforanów;
 - 4) Motyw IR4 jako miejsce oddziaływania regulatora specyficznego dla rizobiów.
- Wykazanie, że białko RosR pełni bardzo ważną funkcję w regulacji syntezy EPS u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i adaptacji tych bakterii do warunków panujących w glebie oraz podczas symbiotycznych interakcji z gospodarzem roślinnym. Potwierdzają to następujące cechy fenotypowe mutantów *rosR*:
 - 1) 3-krotnie niższy poziom syntezy EPS w porównaniu do szczepu dzikiego, w którym wykryto jedynie niewielką ilość frakcji niskocząsteczkowej o funkcji cząsteczki sygnałnej;
 - 2) Zmiany ilościowe w składzie cukrowym części O-swoistej LPS;
 - 3) Zwiększona wrażliwość na niektóre antybiotyki, detergenty, związki osmotycznie czynne i czynniki stresowe;
 - 4) Zmiany w profilach białek błonowych i zewnątrzkomórkowych;
 - 5) Obniżona zdolność wykorzystywania niektórych źródeł węgla i azotu;
 - 6) Istotnie obniżona ruchliwość komórek i adhezja do korzeni roślin oraz zdolność tworzenia biofilmu;
 - 7) Bardzo istotnie obniżona konkurencyjność oraz zdolność infekcji włóśników korzeniowych i indukowania brodawek na koniczynie (powstające nieliczne brodawki były nieefektywne w wiązaniu azotu).
- Wykazanie istotnej roli EPS w adaptacji rizobiów do warunków glebowych oraz w skutecznej infekcji korzenia rośliny motylkowatej i efektywnej symbiozie. Potwierdzają to wyniki uzyskane dla szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zawierających dodatkowe kopie genów *rosR* i *pssA*. Obecność dodatkowych kopii tych genów powodowała prawie 2-krotny wzrost syntezy EPS i przyczyniała się do istotnego polepszenia wszystkich własności symbiotycznych (liczba brodawek indukowanych na korzeniach, liczba bakterii zasiedlających daną brodawkę i masa części nadziemnej rośliny).
- Opracowanie szybkiej i skutecznej metody identyfikacji izolatów pochodzących z gleby lub brodawek korzeniowych, które należą do gatunku *R. leguminosarum* w oparciu o reakcje PCR i sekwencje genów związanych z syntezą EPS.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w 7 oryginalnych pracach naukowych (*Antonie van Leeuwenhoek* (2), *Mol. Plant Microbe Interact.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, *Arch. Microbiol.*, *BMC Microbiol.*, *Int. J. Mol. Sci.*) oraz 1 pracy przeglądowej (*Int. J. Mol. Sci.*). We wszystkich pracach oryginalnych byłam głównym wykonawcą

przedstawionych eksperymentów. Wyniki te były również prezentowane przeze mnie w formie referatów na 2 konferencjach krajowych (Polski Kongres Genetyki 2004 r. i 2007 r.) oraz 1 konferencji międzynarodowej (8th European Nitrogen Fixation Conference, Belgia 2008 r.).

Realizacja powyższych zadań badawczych była możliwa dzięki pozytywnie zakończonym staraniom o uzyskanie dodatkowego finansowania moich badań – łącznie 5 projektów. Byłam kierownikiem jednego projektu MNiSW (nr N N303 092234: 2007-2011), wykonawcą badań w 2 grantach MNiSW (nr 6 PO4A 058 18: 2000-2003 i nr 2 PO4A 094 26: 2004-2007) oraz głównym wykonawcą w Interdyscyplinarnym grantie zespołowym Prorektora UMCS ds. Nauki (nr NB-16-2009: 2009) i grantie indywidualnym Prorektora UMCS ds. Badań Naukowych i Współpracy z Zagranicą (nr NB-23-2002: 2002).

Za opublikowane prace otrzymałam dwukrotnie nagrodę zespołową Rektora UMCS I stopnia (2010 i 2011) oraz nagrodę zespołową II stopnia Polskiego Towarzystwa Genetycznego w 2002 r. Ponadto, występowałam o dofinansowanie uczestnictwa w międzynarodowych konferencjach. Moje starania zaowocowały uzyskaniem stypendium konferencyjnym (FEMS Young Scientist Grants) na udział w 5th European Nitrogen Fixation Conference, Wielka Brytania 2002 r.

PRACA NAUKOWA PO DOKTORACIE NIEWLICZANA DO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO STANOWIĄCEGO MONOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI

Po doktoracie brałam również udział w badaniach dotyczących innych własności bakterii *R. leguminosarum*, które obejmowały m. in. syntezę lipopolisacharydu (LPS) oraz charakterystykę szczepów zawierających mutacje wpływające na syntezę tej makrocząsteczki. LPS rizobiów pełni bardzo ważną funkcję w adaptacji tych bakterii do warunków panujących wewnątrz brodawki korzeniowej. Ustalono, że mutacje w regionie międzygenowym *pssB-pssA* oraz w genie *pssB* wpływają na szereg procesów, do których należą m.in. zmiany w syntezie LPS (*J. Plant Physiol.* 2001, *Acta Biol. Cracov. Bot.* 2007, *Biochemistry-Moscow* 2011). Do badań tych został włączony mutant Rt120 uzyskany w wyniku przypadkowej mutagenyzy z użyciem transpozonu Tn5, który nie produkował EPS i syntetyzował LPS o zmienionej strukturze części O-swoistej. Wykazałam obecność transpozonu Tn5 w genomie tego mutantu, w odległości 93 nt poniżej genu *pssB* i 675 nt przed genem *pssA*. Przeprowadzona przeze mnie identyfikacja miejsca insercji Tn5 w Rt120 i analiza sekwencyjna tego regionu DNA wykazała, że mutacja sekwencji położonej w znacznej odległości od *pssA* wywołuje taki sam negatywny efekt na proces syntezy EPS, jak mutacja tego genu w obrębie jego otwartej ramki odczytu (*J. Plant Physiol.* 2001). Wskazuje to na obecność w tym miejscu regionu regulatorowego motywów

ważnych w regulacji ekspresji *pssA*. We współpracy z Katedrą Botaniki SGGW w Warszawie scharakteryzowane zostały struktury brodawek indukowanych na koniczynie przez mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* niezdolne do syntezy EPS oraz wykazujące zmienioną syntezę EPS i LPS (Rt120, Rt12A). Analiza mikroskopowa brodawek indukowanych przez szczep Rt120 wykazała, że były one nieefektywne w wiązaniu azotu i zawierały jedynie nieliczne bakteroidy. Szczep Rt12A zawierający mutację genu *pssB* również utracił zdolność nawiązywania efektywnej symbiozy. Brodawki indukowane przez tego mutantu gromadziły ogromne ilości skrobi, tworzyły nietypowe puste struktury błonowe wewnątrz komórek i wykazywały defekt w uwalnianiu bakterii do komórek roślinnych (*Acta Biol. Cracov. Bot.* 2007).

Dalsza analiza funkcjonalna genu *pssA* wykazała, że może on pełnić bardziej ogólną rolę w metabolizmie bakterii, wpływając dodatkowo na inne geny *R. leguminosarum* (*Res. Microbiol.* 2003). Zaobserwowano, że *pssA* komplementuje oprócz mutacji we własnym genie, także mutacje w innych genach, które powodują zahamowanie syntezy EPS. Dodatkowe kopie genu *pssA* wprowadzone na plazmidzie do siedmiu mutantów Exo⁻ przywracały produkcję EPS. Dokonałam identyfikacji miejsc insercji transpozonu Tn5 w tych szczepach i ustaliłam, że mutacje te znajdowały się w obrębie genów kodujących między innymi: liażę (mutant Rt55), składnik systemu transportu żelaza (Rt56), receptor sideroforu (Rt66) i pirofosfatazę NADH (Rt80). Wyniki te sugerują, że białko PssA, oprócz aktywności enzymatycznej, może dodatkowo posiadać funkcję regulatorową. Potwierdzają to również badania innych naukowców, które pokazują zmieniony poziom kilkunastu białek w mutancie *pssA R. leguminosarum* bv. *trifolii* w porównaniu do szczepu dzikiego. Jestem również współautorem pracy przeglądowej dotyczącej genetycznej kontroli syntezy egzopolisacharydów rizobiowych i ich funkcji w symbiozie (*Microb. Cell Fact.* 2006).

Ponadto, prowadzę współpracę z Instytutem Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, której efektem było opracowanie metody badania potencjału elektrokinetycznego rizobiów w celu wykorzystania do charakterystyki tych bakterii w różnych stanach fizjologicznych oraz w różnych rodzajach pożywek (*J. Microbiol. Meth.* 2011). Potencjał elektrokinetyczny jest jednym z parametrów określających właściwości fizykochemiczne ściany bakterii. Zbadano wpływ takich czynników, jak: rodzaj pożywki, faza wzrostu bakterii, gęstość zawiesiny bakteryjnej i temperatura pomiaru. Ustalono, że wszystkie te czynniki mają wpływ na potencjał elektrokinetyczny *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, z których rodzaj pożywki użytej do przygotowania zawiesin bakteryjnych ma największe znaczenie. W dalszych planach zamierzamy określić właściwości powierzchniowe rizobiów w aspekcie ich adhezji do korzeni roślin motylkowatych dla kilku wybranych układów

symbiotycznych. Uzyskane wyniki przyczynią się do lepszego zrozumienia interakcji zachodzących pomiędzy bakterią a gospodarzem roślinnym, co mogłoby zostać w przyszłości wykorzystane dla podniesienia wydajności symbiozy. Projekt o takim tytule został złożony na konkurs do Narodowego Centrum Nauki (2011 r.).

W ostatnim czasie moje zainteresowania naukowe skupiają się również na genetycznej charakterystyce innych organizmów, takich jak: *Fusarium culmorum* oraz *Trichoderma harzianum*, które prowadzę we współpracy z Zakładem Mikrobiologii Środowiskowej oraz Zakładem Mikrobiologii Przemysłowej UMCS. Izolaty *F. culmorum* charakteryzują się dużym zróżnicowaniem genetycznym oraz fizjologicznym, co objawia się różnym wpływem na wzrost roślin, od własności promujących wzrost, przez umiarkowanie szkodliwe, aż po patogeniczne. Wykazano, że ten różny wpływ poszczególnych izolatów na rośliny wynika z różnic w aktywnościach określonych enzymów hydrolitycznych i te różnice fenotypowe można skorelować z zaobserwowanymi różnicami filogenetycznymi. Dla kilku wybranych izolatów, będących przedstawicielami poszczególnych grup *F. culmorum* ze względu na ich różny wpływ na rośliny, wykonałam analizę filogenetyczną w oparciu o sekwencję obejmującą 2 regiony międzygenowe oraz gen 5.8S rRNA (ITS1, 5.8S rRNA i ITS2). Ustaliłam, że patogeniczny izolat DEMFc37 był najbardziej odległy filogenetycznie od pozostałych analizowanych izolatów, a izolat DEMFc2 promujący wzrost roślin znajdował się w grupie obejmującej inne izolaty *F. culmorum* o takich własnościach (*Mycologia* 2011).

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących identyfikacji i analizy funkcjonalnej genu kodującego α -1,3-glukanazę (mutanazę) *T. harzianum*, która ma zdolność hydrolizy wiązań α -1,3-glikozydowych występujących w glukanach ścian komórkowych grzybów oraz budujących płytkę nazębną. Enzym ten jest skutecznym narzędziem w rozkładzie ściany komórkowej grzybów patogenicznych oraz wykazuje zdolność degradacji mutanu syntetyzowanego przez bakterie próchnicotwórcze (*Streptococcus*). Wykonałam analizę sekwencji *mutAW* na poziomie DNA i białka oraz analizę filogenetyczną tego genu. *mutAW* *T. harzianum* wykazuje wysoką homologię sekwencji do genu mutanazy *Hypocrea lixii* (96,2% identyczności) i *T. asperellum* (82,8%) oraz genu *mutA* *Penicillium purpurogenum* (72,7%). Ustaliłam, że gen *mutAW* o długości 2000 nt zawiera 2 introny o 52 nt i 43 nt, a jego cDNA koduje białko o masie 68 kDa (634 aa). 111 nukleotydów od końca 5' genu koduje peptyd sygnałowy o długości 37 aminokwasów. Określiłam, że α -1,3-glukanaza jest wysoce konserwatywnym białkiem i zawiera dwie funkcjonalne domeny: N-terminalną domenę katalityczną (38-490 aa) i C-terminalną domenę (551-634 aa) wiążącą polisacharyd. Sekwencja genu *mutAW* została

wprowadzona do bazy danych GenBank, a wyniki tych analiz zostały ostatnio opublikowane (*Pol. J. Microbiol.* 2011).

W okresie ostatnich kilku lat zajmuję się także badaniami genetycznymi dotyczącymi bakterii z rodzaju *Legionella*, które odpowiedzialne są za wywołanie atypowego zapalenia płuc, zwanego legionellozą. Dotychczasowe dane wskazują, że *Legionella* to bardzo zróżnicowana grupa bakterii, zarówno pod względem genetycznym, jak i biochemicznym, która obejmuje obecnie 52 gatunki. Patogenność tych bakterii zależy od wielu makrocząsteczek powierzchniowych, do których należą m.in. fosfolipidy. Wiedza na temat fosfolipidów *Legionella* jest fragmentaryczna i dotyczy głównie najbardziej patogennego gatunku *L. pneumophila*. Jednym z fosfolipidów jest fosfatydylocholina, której obecność została wykryta u bakterii symbiotycznych i patogennych wchodzących w interakcje z komórkami eukariotycznymi. Ten składnik błony bakteryjnej może być syntetyzowany przez dwa alternatywne szlaki: jednoetapową syntezę z udziałem enzymu PcsA oraz szlak trzyetapowej metylacji, w którym uczestniczy białko PmtA. Wykazano, że oba szlaki są obecne u *L. pneumophila*, jak również u symbiotycznych bakterii *R. leguminosarum* i *S. meliloti*. Stąd, podjęte zostały przez nas próby identyfikacji szlaków biosyntezy fosfatydylocholiny u innych wysoce patogennych gatunków *Legionella* (*L. bozemanae*, *L. micdadei* i *L. dumofii*) oraz określenia struktury fosfolipidów i roli w wirulencji tych bakterii. Dotychczas udowodniliśmy, że gatunek *L. bozemanae*, podobnie jak *L. pneumophila*, posiada oba funkcjonalne szlaki syntezy fosfatydylocholiny. Przeprowadzone przeze mnie analizy wykazały, że genom *L. bozemanae* zawiera geny *pmtA* oraz *pcsA*, niezbędne do funkcjonowania tych szlaków. Ze względu na dość niskie podobieństwo sekwencji genów *pmtA* i *pcsA* *L. pneumophila* do genów homologicznych *L. bozemanae* (co zostało wykazane w hybrydyzacji typu Southern), do identyfikacji i uzyskania sekwencji tych genów zastosowano startery zdegenerowane. Ustaliłam, że gen *pcsA* *L. bozemanae* wykazywał największe podobieństwo sekwencji do *pcsA* *L. longbeachae* (80% identyczności), a niższe podobieństwo sekwencji do *pcsA* *L. drancourti* (75,5%) i *L. pneumophila* (72%). Również gen *pmtA* *L. bozemanae* wykazywał największe podobieństwo sekwencji do genu homologicznego *L. longbeachae* (79,3% identyczności), a niższe podobieństwo do *pmtA* *L. pneumophila* (73,6%). Wyniki te wskazują, że *L. bozemanae* jest bliżej spokrewniony z gatunkiem *L. longbeachae*, a bardziej odległy filogenetycznie od gatunku *L. pneumophila* (*Microbiol. Res.* 2011). Ponadto, jestem współautorem pracy przeglądowej dotyczącej bakterii *Legionella* i odpowiedzi immunologicznej, jaką one wywołują (*Folia Microbiol.* 2010). Identyfikacja i analiza funkcjonalna genów homologicznych do *pmtA* oraz *pcsA* u dwóch kolejnych gatunków *Legionella* (*L. dumofii* i *L. micdadei*) jest przeprowadzana przeze mnie w ramach projektu MNiSW (nr N303 822640: 2011-2014) pt.: „Genetyczne i biochemiczne

badanie szlaków biosyntezy fosfatydylocholiny *Legionella* spp.”, którego jestem głównym wykonawcą. Jednym z zamierzeń tego projektu jest opracowanie szybkiej i wiarygodnej metody diagnostycznej do identyfikacji infekcji wywoływanych przez ten rodzaj bakterii, opierającej się na reakcji multiplex-PCR i starterach komplementarnych do sekwencji genów *pmtA* i *pcsA*.


Monika Janczarek