

Streszczenie

Biologiczne wiązanie azotu (ang. Biological Nitrogen Fixation, BNF) jest procesem przeprowadzanym przez bakterie, w którym azot atmosferyczny jest redukowany do amoniaku. Najważniejszą grupę bakterii zdolną do przeprowadzania BFN stanowią mikroorganizmy z rodziny *Rhizobiaceae*, zwane ogólnie rizobiami, które mają zdolność do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi. Badania dotyczące tego typu symbiozy są istotne, gdyż rośliny bobowate mają duże znaczenie użytkowe, natomiast rizobia znacząco wzbogacają glebę w składniki odżywcze niezbędne do wzrostu roślin. W wyniku symbiotycznej interakcji rizobiów z roślinami bobowatymi dochodzi do rozwoju specjalnych struktur na korzeniach lub pędach, zwanych brodawkami, wewnątrz których bakterie te przekształcają się w bakteroidy wiążące azot atmosferyczny. Nawiązanie symbiozy rizobia – rośliny bobowate jest złożonym procesem, który wymaga wymiany szeregu sygnałów molekularnych między symbiotycznymi partnerami. Najważniejszymi z nich są roślinne flawonoidy oraz bakteryjne czynniki Nod i egzopolisacharydy (EPS).

W warunkach braku gospodarza roślinnego rizobia bytują w glebie jako wolno żyjące mikroorganizmy. Wówczas są one narażone na działanie szeregu czynników, które wpływają niekorzystnie na ich przeżycie i namnażanie. Rizobia musiały zatem wykształcić mechanizmy umożliwiające im przystosowanie do różnych stresów środowiskowych (są to m.in.: quorum-sensing, systemy transportu białek, synteza polisacharydów powierzchniowych i zdolność poruszania się).

Zdolność zasiedlania różnych nisz ekologicznych przez rizobia (gleba, ryzosfera, brodawki) sugeruje, że występują u nich złożone sieci regulatorowe, które umożliwiają przystosowanie do różnych warunków środowiskowych. Kluczową rolę w odpowiedzi bakterii na te zmiany odgrywa regulacja ekspresji genów. Wykazano, że białka należące do rodziny transkrypcyjnych regulatorów Ros/MucR są bardzo ważnym elementem sieci regulatorowej u rizobiów. Do rodziny tej należy m.in. białko RosR *R. leguminosarum* bv. trifolii, które wykazuje znaczące podobieństwo sekwencji do białka RosR pokrewnej bakterii *Rhizobium etli* oraz białek MucR *Ensifer meliloti* i *E. fredii*. Białka Ros i MucR zaangażowane są w regulację syntezy EPS i nawiązanie efektywnej symbiozy z roślinnymi gospodarzami. Mutacje w genach *rosR* i *mucR* wpływają negatywnie nie tylko na nawiązanie symbiozy tych bakterii z roślinami bobowatymi, ale powodują również zaburzenia w

funkcjonowaniu wolno żyjących komórek. Dane te sugerują istotną rolę białek z rodziny Ros/MucR w sieci regulacyjnej rizobiów.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie roli białka RosR w regulacji transkrypcji genów *R. leguminosarum* bv. trifolii oraz poznanie mechanizmów uczestniczących w regulacji ekspresji genu kodującego to białko.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że regulacja transkrypcji *rosR* *R. leguminosarum* bv. trifolii jest złożona i uczestniczą w niej motywy regulatorowe znajdujące się w regionie promotorowym tego genu (tj. element UP, „TGn-extended -10” oraz motywy: IR3, IR5 i IR6), jak również białko PraR. Motywy IR5 i IR6 zaangażowane są także w tworzenie i stabilizację struktur drugorzędowych mRNA *rosR*. Regulacja ta zapewnia utrzymanie odpowiedniego poziomu białka RosR w komórce. Przeprowadzona analiza porównawcza transkryptomów szczepu dzikiego *R. leguminosarum* bv. trifolii Rt24.2 i mutanta w genie *rosR* Rt2472 wykazała, że białko RosR wpływa na transkrypcję 1106 genów. Do regulonu RosR należą liczne geny związane z ruchliwością rizobiów, regulacją transkrypcji, syntezą powierzchniowych polisacharydów i innych komponentów otoczki bakteryjnej, syntezą składników różnych systemów transportu oraz innymi procesami komórkowymi. Skutkiem zmian w poziomie transkrypcji tych genów były różnice w cechach fenotypowych mutanta Rt2472 w stosunku do szczepu dzikiego Rt24.2. Zaobserwowano różnice w profilach białek zewnątrzkomórkowych, błonowych i peryplazmatycznych, poziomie syntezy różnych polisacharydów (CPS, GPS i cyklicznych β -glukanów), agregacji i ruchliwości komórek, jak również ich własnościach powierzchniowych (hydrofobowości, właściwościach nanomechanicznych oraz przepuszczalności błony zewnętrznej). Mutacja w genie *rosR* powoduje również zaburzenia w nawiązaniu symbiozy *R. leguminosarum* bv. trifolii z koniczyną.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że białko RosR jest globalnym regulatorem ekspresji genów u *R. leguminosarum* bv. trifolii, który odgrywa kluczową rolę w przystosowaniu tej bakterii do życia w środowisku glebowym oraz w symbiozie z roślinnym gospodarzem. Transkrypcja genu *rosR* podlega bardzo złożonej regulacji, w której uczestniczą liczne elementy zlokalizowane w regionie promotorowym tego genu oraz białko PraR. Białko RosR reguluje w sposób bezpośredni bądź pośredni ekspresję wielu genów uczestniczących w adaptacji *R. leguminosarum* bv. trifolii do stresu środowiskowego.

Kamila Radwań