

Kamil Żebracki

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

„Rola białek RepA w regulacji ekspresji kaset *repABC* oraz aktywnej segregacji megaplazmidów *Rhizobium leguminosarum*”

Rizobia to glebowe bakterie, które tworzą symbiozę z roślinami bobowatymi. Rośliny dostarczają bakteriom związki węgla, które są produktami fotosyntezy, natomiast bakterie, w brodawkach indukowanych na korzeniach lub łodygach tych roślin, wiążą azot atmosferyczny, zaopatrując swoich gospodarzy w łatwo przyswajalne związki azotu. Badania podstawowe tej unikalnej grupy bakterii mają duże znaczenie dla agrobiotechnologii: symbioza rizobiów z roślinami jest kluczowym procesem w obiegu azotu w biosferze i jedną z głównych dróg wprowadzania związków azotowych do gleby. Zastosowanie wyselekcjonowanych lub zmodyfikowanych szczepów rizobiów jako bionawozów, jak również wykorzystanie metabolitów tych bakterii jako stymulatorów wzrostu roślin bobowatych, pozwala na znaczne ograniczenie nawożenia azotowego i rozwój tzw. zrównoważonego i ekologicznego rolnictwa.

Wieloczęściowy genom rizobiów tworzą chromosom oraz duże i często liczne plazmidy. Geny odpowiedzialne za proces symbiozy z roślinami są zazwyczaj zlokalizowane na plazmidach (tzw. plazmidach symbiotycznych). Plazmidy stanowią także znaczny potencjał metaboliczny i adaptacyjny rizobiów do zmiennego środowiska bytowania tych bakterii. Plazmidy rizobiów są niskokopioowe, co wymaga obecności ściśle kontrolowanych systemów replikacyjnych i partycyjnych, pozwalających na stabilne dziedziczenie replikonów. Zapewniają im to kasety *repABC*, w których znajdują się zarówno elementy odpowiedzialne za replikację (*repC*, *oriV*, *inca*), jak i aktywną segregację (partycję) zreplikowanych kopii plazmidów (*repA*, *repB*, *parS*).

Proces aktywnej segregacji zależy od obecności trzech podstawowych elementów: sekwencji centromeropodobnej (*parS*), białka swoiście wiążącego się z tą sekwencją (białko typu CBP – RepB) i białka typu NTPazy (RepA), będącego motorem procesu segregacji. W procesie partycji plazmidów dimery białka CBP wiążą się z sekwencją centromeropodobną, tworząc kompleks partycyjny, tzw. segrosom. Kompleks nukleoproteinowy CBP–*parS* jest rozpoznawany przez białko NTPazę, które polimeryzując doprowadza do rozdziału plazmidów do komórek potomnych, wykorzystując energię uzyskaną z hydrolizy nukleotydów. Duża stabilność segregacyjna i precyzyjnie regulowane mechanizmy replikacyjne sprawiają, że

replikony *repABC* mogą znaleźć zastosowanie w konstrukcji nowych wektorów plazmidowych i w modyfikacji złożonych genomów bakterii glebowych.

Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było poznanie mechanizmów regulacji ekspresji genów *repABC* oraz molekularna charakterystyka białek partycyjnych RepA w kontekście ich udziału w aktywnym rozdziale plazmidów w modelowym szczepie *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (RtTA1). Genom RtTA1 składa się z pięciu replikonów: chromosomu i czterech plazmidów, z których każdy jest wyposażony w kasetę *repABC*. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na stwierdzenie, że geny *repABC* plazmidów szczepu RtTA1 stanowią operony, których transkrypcja rozpoczyna się z promotora zlokalizowanego powyżej genu *repA*, a inicjacja transkrypcji podlega złożonej negatywnej autoregulacji, sprawowanej przez oddziałujące ze sobą białka partycyjne RepA i RepB. We wszystkich operonach *repABC* zmapowano promotory oraz elementy operatorowe, zawierające odwrócone powtórzenia sekwencji nukleotydowych, które stanowią miejsca wiązania RepA. Stosując testy *in vitro* z wykorzystaniem rekombinowanych białek RepA wykazano, że poszczególne białka RepA wiążą się bardzo specyficznym wyłączenie do operatorów pochodzących z plazmidów rodzicielskich. Specyficzność oddziaływania białka RepA z operatorem zależy od obecności ADP/ATP. W toku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że wszystkie białka RepA plazmidów RtTA1 tworzą w roztworze stabilne dimery/multimery, a stopień ich oligomeryzacji jest również zależny od ATP. Dimeryzacja/oligomeryzacja białek RepA jest niezbędnym etapem prowadzącym do związania operatora lub do przeprowadzenia partycji zreplikowanych plazmidów. Potwierdzono eksperymentalnie, że domena odpowiedzialna za dimeryzację białek RepA zlokalizowana jest w N-końcowej części białka.

Podsumowując, udowodniono podwójną rolę białek RepA, tj. ich udział zarówno w procesie aktywnej segregacji, jak i w negatywnej autoregulacji ekspresji operonów *repABC*. Precyzyjna regulacja ekspresji operonów *repABC*, oparta na specyficznym oddziaływaniu białek typu NTPazy – RepA z elementami operatorowymi plazmidów rodzicielskich, jest jednym z kluczowych elementów zgodnego współwystępowania kilku replikonów wyposażonych w bardzo podobne systemy replikacyjne/partycyjne w jednej komórce bakteryjnej. Analiza kaset *repABC* czterech plazmidów występujących w komórkach RtTA1, pozwoliła na wskazanie ich wspólnych cech, jak również subtelnych różnic w regulacji ich ekspresji, które mogą mieć znaczenie w stabilnym utrzymywaniu się plazmidów.

Kamil Zbrodzi