

**UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII**

AUTOREFERAT

**Model kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za biosyntezę
i regulację stopnia polimeryzacji egzopolisacharydu
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii***

Małgorzata Marczak

Lublin 2019

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki	
a) tytuł osiągnięcia naukowego.....	4
b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
c) omówienie celu naukowego pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	6
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych	
5.1 Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora.....	24
5.2 Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	29
Podsumowanie dorobku naukowego.....	34
Plany na przyszłość.....	35

1. Imię i nazwisko

Małgorzata Marczak
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19
20-033 Lublin

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2008 Stopień doktora nauk biologicznych

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Dyscyplina: biologia

Tytuł rozprawy: „Lokalizacja i funkcja białek PssN i PssO w systemie transportu egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*”

Promotor: Prof. dr hab. Anna Skorupska

Praca doktorska została obroniona 14 maja 2008 r.

2002 Tytuł magistra biotechnologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wydział Biologii i Nauk o Ziemi

Tytuł pracy: "Analiza struktur drugorzędowych białek PssT i PssN *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1"

Promotor: Prof. dr hab. Anna Skorupska

Praca magisterska została obroniona 14 czerwca 2002 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2008 – obecnie*

Adiunkt w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
(do 2011 roku: Wydział Biologii i Nauk o Ziemi)
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

*** 01.2010 - 02.2011: urlop macierzyński i wychowawczy**

01.10.2002 – 30.09.2008

Asystent w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii
(do 2007 roku: Zakład Mikrobiologii Ogólnej)
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

"Model kompleksu enzymatycznego odpowiedzialnego za biosyntezę i regulację stopnia polimeryzacji egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*"

b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. **Marczak M***, Żebracki K, Koper P, Turska-Szewczuk A, Mazur A, Wydrych J, Wójcik M, Skorupska A. 2019. Mgl2 is a hypothetical methyltransferase involved in exopolysaccharide production, biofilm formation and motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. MPMI. doi: 10.1094/MPMI-01-19-0026-R.

MNiSW₂₀₁₆ 40 IF₂₀₁₇ 3,588

2. **Marczak M***, Mazur A, Koper P, Żebracki K, Skorupska A. 2017. Synthesis of rhizobial exopolysaccharides and their importance for symbiosis with legume plants. *Genes (Basel)*. 8(12):360. doi:10.3390/genes8120360.

MNiSW₂₀₁₆ 25 IF₂₀₁₇ 3,191

3. **Marczak M***, Matysiak P, Kutkowska J, Skorupska A. 2014. PssP2 is a polysaccharide copolymerase involved in exopolysaccharide chain-length determination in *Rhizobium leguminosarum*. *PLoS One*. 9(9):e109106. doi:10.1371/journal.pone.0109106.

MNiSW₂₀₁₄ 40 IF₂₀₁₄ 3,234

4. Stasiak G, Mazur A, Wielbo J, **Marczak M**, Żebracki K, Koper P, Skorupska A. 2014. Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *J Appl Genet*. 55(4):515-527.

MNiSW₂₀₁₄ 20 IF₂₀₁₄ 1,477

5. **Marczak M***, Dźwierzynska M, Skorupska A. 2013. Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Biol Chem*. 394:541-559.

MNiSW₂₀₁₃ 25 IF₂₀₁₃ 2,689

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

MNiSW₂₀₀₈ 20 IF₂₀₀₈ 3,071

*** autor korespondencyjny**

Suma punktów MNiSW wg roku opublikowania* 170
Sumaryczny IF wg roku opublikowania 17,250

* punktację MNiSW dla prac opublikowanych po 2017 r. podano zgodnie z przepisami wprowadzającymi ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, czyli wg wykazu z dnia 25 stycznia 2017 r. wskazanego jako wykaz czasopism naukowych obowiązujący podczas ewaluacji za lata 2017-2018

c) omówienie celu naukowego ww. pracy i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Prace składające się na przedstawione osiągnięcie naukowe stanowią cykl pięciu spójnych koncepcyjnie artykułów oryginalnych oraz jednego artykułu przeglądowego, poświęconych **funkcjonalnej charakterystyce białek tworzących system transportu egzopolisacharydu glebowej bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* oraz analizie czynników wpływających na polimeryzację i regulację stopnia polimeryzacji tego polisacharydu**. Przedmiotem badań przedstawianego osiągnięcia było również powiązanie zaburzeń ilościowych/jakościowych w produkcji egzopolisacharydu z innymi szlakami metabolicznymi i właściwościami rizobiów istotnymi dla ich saprofitycznego i symbiotycznego trybu życia.

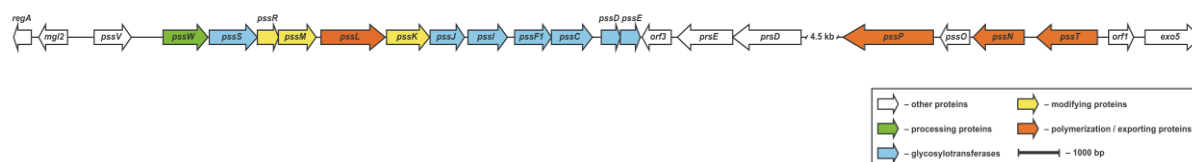
Wprowadzenie

Rizobia należą do unikalnej grupy bakterii zdolnych do wchodzenia w interakcje symbiotyczne z roślinami bobowatymi (Fabaceae). Wewnątrz tworzonych *de novo* organów roślinnych, tak zwanych brodawek korzeniowych, rizobia wiążą azot atmosferyczny. Jednym z czynników decydujących o nawiązaniu i efektywności symbiozy jest egzopolisacharyd (EPS) syntetyzowany przez bakterie. Właściwości i lokalizacja zewnątrzkomórkowa EPS decydują o tym, że stanowią one ważny element chroniący komórki bakterii przed stresorami abiotycznymi i biotycznymi, umożliwiają adhezję, gromadzenie składników odżywczych, wpływają na ruchliwość komórek oraz interakcje z organizmami wyższymi (Becker 2015). Jednocześnie szerokie spektrum właściwości egzopolisacharydów jakie wynikają z różnorodności ich budowy chemicznej, decyduje o ich wykorzystaniu w różnych gałęziach przemysłu (Schmid i wsp. 2015).

Egzopolisacharydy zbudowane z różnych reszt cukrowych, czyli heteropolisacharydy, są syntetyzowane przez bakterie według mechanizmu określanego, jako **Wzx/Wzy-zależny**. W pierwszym etapie, dzięki aktywności glikozylotransferaz zachodzi synteza powtarzających się podjednostek cukrowych w połączeniu z fosforanem undekaprenyłu w błonie wewnętrznej. Kompletne oligosacharydy są przenoszone na peryplazmatyczną stronę błony wewnętrznej dzięki aktywności flipazy i są łączone przez specyficzną polimerazę

polisacharydu. W tym procesie niezbędne jest białko, które decyduje o gatunkowo/szczepowo-specyficjnej wielkości polimerów (tzw. regulator długości łańcuchów, inaczej: kopolimeraza). Dzięki aktywności tego białka komórka bakteryjna produkuje egzopolisacharyd o stałym składzie chemicznym, ale różnych masach cząsteczkowych, co daje charakterystyczny dla gatunku/szczepu skład frakcji, tzw. nisko- i wysokocząsteczkowej (LMW i HMW EPS). Polisacharyd jest transportowany na zewnątrz komórki przez kanał tworzony w osłonach komórkowych przez duże oligomeryczne białka. Uważa się, że transport odbywa się jednocześnie z polimeryzacją (Islam i Lam 2014).

EPS bakterii gatunku *Rhizobium leguminosarum* zbudowany jest z ośmiocukrowych podjednostek złożonych z glukozy, kwasu glukuronowego i galaktozy w stosunku molowym 5:2:1, modyfikowanych podstawnikami niecukrowymi, tj. octanem, pirogronianem i hydroksymaślanem, w sposób szczepowo-specyficzny (Robertson i wsp. 1981; O'Neill i wsp. 1991). Geny determinujące produkcję EPS w *R. leguminosarum* są sukcesywnie charakteryzowane na poziomie molekularnym. Zbadano dotychczas funkcję kilkunastu genów *pss* (ang. *poly*saccharide *syn*thesis) biorących udział w tym procesie. Największe skupisko genów kodujących różne elementy tego szlaku biosyntezy zidentyfikowano w chromosomie *R. leguminosarum*. Region ten, nazwany Pss-I (Rys. 1), zidentyfikowano również w genomach bakterii spokrewnionych z *R. leguminosarum*.



Rys. 1. Organizacja genetyczna regionu Pss-I, w którym zidentyfikowano szereg genów zaangażowanych w biosyntezę egzopolisacharydu w *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 na różnych etapach tego procesu. Oznaczenie kolorystyczne grupuje geny, których funkcja w syntezie podjednostki, polimeryzacji/transportu i modyfikacji EPS została potwierdzona eksperymentalnie lub przewidywana. Zmodyfikowano na podstawie: Marczak i wsp. 2017.

Skupia on geny kodujące glikozylotransferazy odpowiedzialne za syntezę podjednostki EPS, z wyjątkiem genu kodującego białko uczestniczące w pierwszym etapie syntezy, odpowiedzialne za dodanie pierwszej reszty heksozowej do nośnika lipidowego, zlokalizowanego poza Pss-I. Produkty białkowe pozostałych genów *pss* tworzą system polimeryzacji/eksportu EPS, tj. przypuszczalną flipazę (PssL), polimerazę polisacharydu (PssT), kopolimerazę (PssP) oraz białko kanałowe zlokalizowane w błonie zewnętrznej (PssN) (Król i wsp. 2007).

Zewnątrzkomórkowe białko PssO niezbędne w biosyntezie EPS

Jednym z najbardziej zagadkowych genów w regionie Pss-I jest *pssO* zlokalizowany pomiędzy genami *pssN-pssP*. Taka organizacja genetyczna: *pssN-pssO-pssP* (Rys. 1) przypomina konserwatywny układ genów *wza-wzb-wzc* w *E. coli*, gdzie *wza* koduje białko kanałowe błony zewnętrznej podobne do PssN, *wzb* - fosfatazę, zaś gen *wzc* - kinazę tyrozynową pełniącą funkcję kopolimerazy, homologiczną do PssP. PssO nie wykazuje jednak znaczącego podobieństwa (zarówno na poziomie sekwencji aminokwasowej, jak i przewidywanej struktury) ani do fosfatazy Wzb, ani do jakiegokolwiek innego białka o znanej funkcji. Hipotetyczne białka o wysokim stopniu podobieństwa sekwencji aminokwasowej z PssO zidentyfikowałam *in silico* w genomach *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *R. etli*. Ich pokrewieństwo immunologiczne potwierdziłam identyfikując białka reagujące z surowicą anti-PssO tylko w komórkach tych dwóch biotypów. Gen *pssO* poddałam heterologicznej ekspresji w komórkach *E. coli*, a oczyszczone białko PssO-His₆ posłużyło jako antygen do otrzymania surowicy anti-PssO oraz do analizy struktury drugorzędowej metodą FTIR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Białko PssO ma masę ~25 kDa i charakteryzuje się dużą zawartością α -helis (32%), podczas gdy struktury typu β -kartki stanowią ~12%. Przewidywane *in silico* rozmieszczenie struktur drugorzędowych w połączeniu z danymi ilościowymi pochodzącymi z analizy FTIR pozwoliły sklasyfikować PssO jako białko typu $\alpha+\beta$. Takie białka charakteryzuje obecność α -helis i β -kartek rozrzuconych w obrębie polipeptydu tak, że nie są tworzone struktury naddrugorzędowe typu $\beta-\alpha-\beta$.

PssO nie wykazuje istotnego podobieństwa sekwencji aminokwasowej do białek bakteryjnych o znanej funkcji; dostępne narzędzia umożliwiły wykrycie jedynie nieznacznego

podobieństwa hipotetycznej struktury do białek fimbrii/pili *Enterobacteriaceae* oraz endoglukanazy *Streptomyces* sp. Analiza fuzji translacyjnych *pssO-phoA/lacZ* oraz frakcji komórkowych szczepu RtTA1 wykazała, że PssO jest białkiem eksportowanym do peryplazmy i wydzielanym poza komórkę, ale pozostającym w związku z jej powierzchnią. Lokalizację zewnątrzkomórkową/powierzchniową potwierdziła również immunoelektronomikroskopia. Wykazałam, że obecność białka PssO na powierzchni komórki nie jest jednak związana z adhezją rizobiów do włóśników korzeniowych – przyleganie komórek mutantu, jak i szczepu dzikiego do włóśników, było równie efektywne. Mimo zidentyfikowania *in silico* potencjalnych miejsc glikozytacji białka PssO, nie potwierdziłam tej modyfikacji PssO *in vivo* w komórkach RtTA1.

Badania molekularne białka PssO stanowiły kontynuację prac rozpoczętych przed uzyskaniem stopnia doktora i zaowocowały pracą:

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

Wykazałam, że PssO jest białkiem nietypowym dla systemu Wzx/Wzy-zależnego, ale niezbędnym w produkcji EPS: mutant delecyjny *pssO* nie produkuje nawet śladowych ilości egzopolisacharydu. Specyficzne cechy tego białka, m.in. jego unikalność dla wąskiej grupy rizobiów, struktura drugorzędowa bogata w α -helisy, lokalizacja zewnątrzkomórkowa oraz niezbędność dla przepuszczalności osłon komórkowych, nie tłumaczą jednak roli tego białka w syntezie/sekrecji EPS. Niewykluczone, że PssO funkcjonuje jako element strukturalny niezbędny dla złożenia hipotetycznego kompleksu transportera EPS lub jego stabilności. Badanie funkcji białka PssO kontynuowałam w ramach projektu, którego celem było zrekonstruowanie sieci oddziaływań między opisanymi białkami Pss zaangażowanymi w syntezę/sekrecję egzopolisacharydu.

Białka Pss tworzą homo- i heterooligomery

Mechanizmy biosyntezy i transportu polisacharydów muszą być skoordynowane, zatem muszą zależeć od interakcji białek zaangażowanych w te procesy. Badania genetyczne i strukturalne wskazywały, że białka odpowiedzialne za polimeryzację i translokację

polisacharydów oddziałują ze sobą, aczkolwiek są to dotychczas cząstkowe dane o oddziaływaniach białek tego typu w różnych modelach badawczych. Podjęty przeze mnie problem mapowania oddziaływań między białkami Pss oraz interakcji z innymi białkami RtTA1 był naturalną kontynuacją naszych wcześniejszych badań funkcji białek Pss.

Wykazałam, że białka PssT, PssN, PssO i PssP mają zdolność tworzenia struktur homooligomerycznych o różnej liczbie protomerów w kompleksie. Głównym osiągnięciem tej pracy było jednak wykazanie, że polimeraza PssT i kopolimeraza PssP oddziałują ze sobą tworząc kompleks. Oddziaływanie takie wydawało się dotąd oczywiste, chociaż jedyne dane potwierdzające zależność między tymi białkami dotyczyły tylko badań genetycznych z wykorzystaniem heterologicznej komplementacji (Marolda i wsp. 2006). Dane uzyskane przeze mnie z wykorzystaniem bakteryjnego systemu dwuhybrydowego potwierdzili później inni badacze w układzie *in vitro* z wykorzystaniem oczyszczonych białek polimerazy Wzy i kopolimerazy Wzz, na modelu syntezy antygeny O-swoistego LPS *Shigella flexneri* (Nath i Morona 2015). Wyznaczyłam również domeny odpowiedzialne za homooligomeryzację polimerazy i kopolimerazy oraz oddziaływania heterologiczne PssP-PssT. Mapowanie to pozwoliło wyjaśnić fenotyp mutantów *pssP* i *pssT*, charakteryzujących się zaburzeniem ilości EPS i stopnia polimeryzacji frakcji HMW i LMW (Mazur i wsp. 2002;2003). Skrócenie białka PssP od strony C-końca powoduje zaburzenie jego homooligomeryzacji, ale nie znosi oddziaływania z polimerazą polisacharydu PssT. Przeciwnie, skrócona forma kopolimerazy oddziaływała silniej z polimerazą. W mutantach *pssP* skutkuje to produkcją EPS, w którym przeważa forma niskocząsteczkowa (LMW). Skrócenie PssT od strony C-końca nie zaburza znacząco homodimeryzacji białka, ale znosi oddziaływanie z PssP. Zatem niekontrolowana polimeryzacja podjednostek EPS i produkcja większej ilości egzopolisacharydu o wysokocząsteczkowych łańcuchach (HMW) przez mutantą *pssT* jest najprawdopodobniej skutkiem takiego zaburzenia oddziaływań między białkami.

Dotychczas nie wykazano bezpośredniego oddziaływania między flipazą a jakimkolwiek białkiem zaangażowanym w biosyntezę polisacharydów. Jednak w naszym układzie modelowym, powtarzalnie obserwowano słabą interakcję między flipazą PssL a kopolimerazą PssP. Potwierdza to postulowaną kolejność zdarzeń, według której podjednostki oligosacharydowe syntetyzowane na nośniku lipidowym byłyby przekazywane do kompleksu odpowiedzialnego za polimeryzację, zbudowanego z oligomerów białek PssT i

PssP. Ze względu na dwustronne oddziaływania, białko PssP stanowiłoby swoisty pomost między flipazą a polimerazą. Podobny schemat funkcjonowania zaproponowano dla kopolimerazy Wzz zaangażowanej w biosyntezę łańcucha O-swoistego LPS (*Morona et al. 2009*).

Białko PssN jest lipoproteiną zlokalizowaną w błonie zewnętrznej (*Marczak i wsp. 2006*). Wykazałam, że tworzy co najmniej tetramery i niewykluczone, że również struktury wyższego rzędu oraz oddziałuje z białkiem PssP. Uzyskane dane wskazują, że transport EPS powoduje "rozluźnienie" oddziaływań w obrębie homooligomerów PssN i PssP, natomiast "zacieśnienie" interakcji heterologicznej PssN-PssP. Może to wynikać z przejściowych oddziaływań białko-polisacharyd w trakcie wyprowadzania polimeru przez kanał błonowy. Brak produkcji EPS (np. spowodowany mutacją w genie innym niż *PssN* lub *pssP*) powoduje, że oligomer PssN staje się bardziej stabilny i następuje wyraźne "rozluźnienie" interakcji z białkiem PssP. Analiza dwuhybrydowa niejednoznacznie wskazała również na możliwość oddziaływania białka PssN z opisanym wcześniej PssO. Możliwość taką popiera fakt, iż obydwie białka są wyprowadzane z cytoplazmy do błony zewnętrznej (PssN) i poza komórkę (PssO). Sieciowanie *in vitro* i *in vivo* wskazało na możliwość tworzenia przez białko PssO wielopodjednostkowych struktur multimerycznych. Rzuca to nowe światło na ustaloną wcześniej nietypową lokalizację pozakomórkową białka zaangażowanego w produkcję heteropolisacharydu według schematu Wzx/Wzy-zależnego.

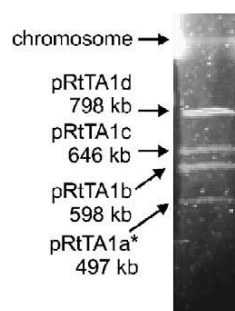
W toku realizacji tego zadania badawczego powtórzyłam analizę *in silico* sekwencji aminokwasowej białka PssT pod kątem obecności motywów aminokwasowych i domen charakterystycznych dla polimeraz polisacharydów. Na tle wcześniej uzyskanych przez nas, a trudnych do wytłumaczenia wyników ustaliłam, że topologia PssT jest bardzo podobna do białka Wzy: poza 12 TMS (ang. *transmembrane segment*) obecne są też dwie kluczowe pętle peryplazmatyczne odpowiedzialne za polimeryzację podjednostek według modelu "catch and release" (*Islam i wsp. 2011*).

Uzyskane wyniki opisano w artykule: ***Marczak M, Dźwierzynska M, Skorupska A. 2013. Homo- and heterotypic interactions between Pss proteins involved in the exopolysaccharide transport system in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. Biol Chem. 394: 541-559.***

Genom dodatkowy rizobiów a geny modulujące ilość i jakość egzopolisacharydu

Produkcja powierzchniowych polisacharydów przez rizobia jest czynnikiem kluczowym dla kolonizacji rizosfery i brodawkowania, obok zdolności bakterii do aktywnego ruchu i chemotaksji, metabolizowania wielu źródeł węgla i energii, produkcji bakteriocyn czy witamin. Geny niezbędne dla bakterii są zazwyczaj zlokalizowane w chromosomie, jednak przykład rizobiów pokazuje, że ogromna pula genów ważnych zarówno w saprofitycznym jak i symbiotycznym stylu życia jest zlokalizowana na plazmidach. Plazmidy stanowią tzw. genom dodatkowy (ang. *accessowy genome*), który może stanowić nawet 35-45% całego genomu tych bakterii (Mazur i Koper 2011).

Genom *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 tworzy pięć replikonów: chromosom i cztery megaplazmidy (pRleTA1a–pRleTA1d) (**Rys. 2**).



Rys. 2. Analiza PFGE genomowego DNA *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. Wielkości plazmidów oszacowano na podstawie wzorca, który stanowił genom szczepu *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841. Najmniejszy plazmid symbiotyczny oznaczono gwiazdką. Zmodyfikowano na podstawie: Król i wsp. 2007 (wielkości poszczególnych replikonów ustalono dokładnie w późniejszej pracy na podstawie analizy restrykcyjnej: Król i wsp. 2008).

Dwa z nich, pRleTA1b i pRleTA1d wykazują cechy tzw. chromidów, tj. replikonów o cechach jednocześnie genomu rdzeniowego i dodatkowego, zaś najmniejszy z plazmidów pRleTA1a to plazmid symbiotyczny, niosący geny niezbędne dla nawiązania efektywnego dialogu między partnerami symbiozy. W celu poznania zależności funkcjonalnych między plazmidami oraz ich wkładu w metabolizm i cechy fenotypowe rizobiów, szczególnie z punktu widzenia zdolności symbiotycznych tych bakterii, eliminowano poszczególne plazmidy ze szczepu RtTA1. Całkowicie wyeliminowano z komórki dwa plazmidy pRleTA1b

i pRleTA1d mające cechy chromidów. Nie udało się wyeliminować plazmidu pRleTA1c, a plazmid symbiotyczny pRleTA1a utracił tylko fragment cząsteczki i uległ rearanzacji.

Fakt, że plazmid pRleTA1c nie został wyeliminowany świadczy o tym, że musi nieść geny istotne dla metabolizmu. Spośród niewielkiej liczby zsekwencjonowanych genów plazmidowych na pRleTA1c zmapowano wcześniej geny związane z biosyntezą LPS, metabolizmem cukrów, pobieraniem aminokwasów czy metabolizmem nukleotydów flawinowych. Przeszukiwanie bazy genów z wykorzystaniem dostępnych sekwencji kontigów genomu RtTA1 wykazało, że szereg genów plazmidu pRleTA1c koduje hipotetyczne ABC-transportery peptydów, aminokwasów, żelaza oraz cukrów.

Geny kluczowe dla nawiązania symbiozy znajdują się na plazmidzie symbiotycznym, ale inne geny ważne w tym procesie (np. geny kodujące białka związane z biosyntezą polisacharydów) mogą być rozsiane w genomie, w tym na plazmidach. Szczepy pochodne z delecją fragmentu plazmidu pRleTA1a produkowały więcej EPS niż szczep dziki, wykazywały taką samą, lub wyraźnie obniżoną autoagregację oraz tworzyły znacznie mniej biofilmu. Ruchliwość szczepów pozbawionych różnych fragmentów plazmidu symbiotycznego pozostała niezmieniona. Przeszukiwanie bazy genów istotnych wykazało obecność w pRleTA1a hipotetycznych genów kodujących transportery, systemy dwuskładnikowe oraz białka związane z tworzeniem przegrody podziałowej.

Szczep pozbawiony plazmidu pRleTA1b wykazywał znacznie zmniejszone tempo podziałów i biomasę biofilmu, ale zwiększoną autoagregację. Pochodna ta była również najbardziej metabolicznie defektywna. Zaskakująco, szczep ten był najbardziej efektywny symbiotycznie. Sugeruje to, że na plazmidzie pRleTA1b są geny, których utrata jest sytuacją stresową dla bakterii, lecz nie ma genów niezbędnych dla biosyntezy EPS, gdyż podobnie jak pozostałe szczepy bez plazmidów ten szczep charakteryzuje się zwiększoną produkcją egzopolisacharydu. Dominującym elementem fenotypu pochodnej bez plazmidu pRleTA1d był brak ruchliwości w podłożu półpłynnym (ang. *swimming motility*). Większość genów odpowiedzialnych za ruchliwość i chemotaksję jest zlokalizowana na chromosomie *R. leguminosarum*, niewykluczone więc, że w plazmidzie pRleTA1d obecne są geny powiązane funkcjonalnie z głównym regionem chemotaksji.

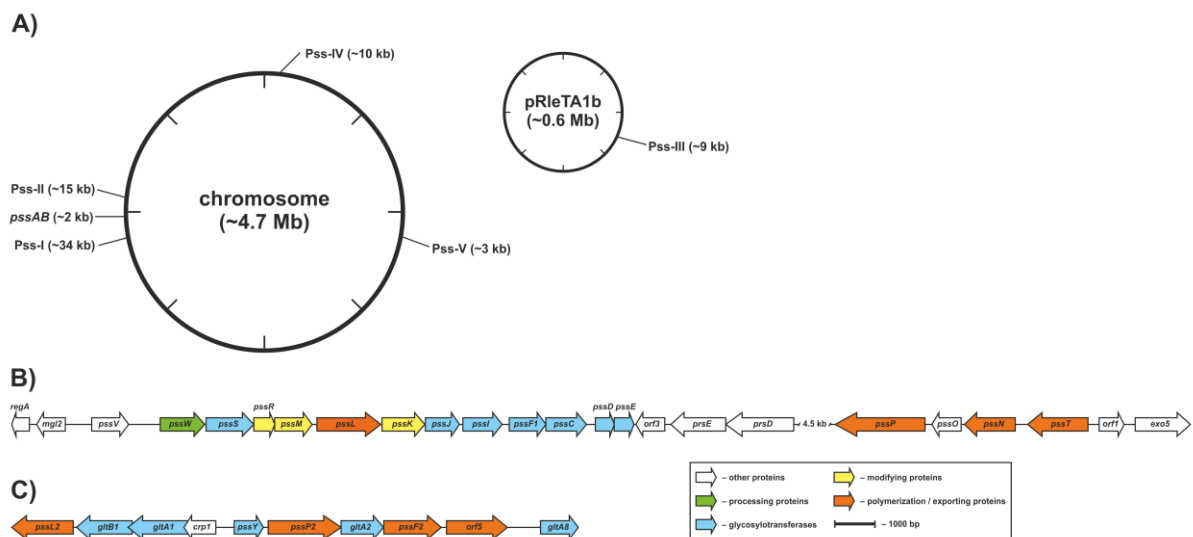
Powyższe wyniki opisano w artykule: **Stasiak G, Mazur A, Wielbo J, Marczak M, Żebracki K, Koper P, Skorupska A. 2014. Functional relationships between plasmids and**

their significance for metabolism and symbiotic performance of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. J Appl Genet. 55(4):515-527.

Złożony fenotyp pochodnych szczepu RtTA1 bez poszczególnych plazmidów, lub zawierających tylko fragment plazmidu, potwierdza istnienie skomplikowanej sieci powiązań między genami zlokalizowanymi w różnych replikonach, a mających wpływ na biosyntezę EPS i innych polisacharydów zewnątrzkomórkowych oraz na cechy powiązane funkcjonalnie z EPS, np. ruchliwość. W szczepie RtTA1 zidentyfikowano dotychczas pięć regionów PssI-PssV (**Rys. 3**), w których zgrupowane są geny o potwierdzonej lub przewidywanej funkcji w produkcji egzopolisacharydu oraz innych polisacharydów, takich jak LPS czy celuloza.

Nowe elementy systemu polimeryzacji egzopolisacharydu

Region Pss-I jest największym skupiskiem genów zaangażowanych w biosyntezę/transport egzopolisacharydu. Jednak nasze analizy *in silico* sekwencji genów tzw. regionu Pss-II oddalonego o 200 kbp od Pss-I, wykazały, że geny zgrupowane w tym regionie również wykazują podobieństwo sekwencji i organizacji do genów kodujących składniki systemu Wzx/Wzy-zależnego (**Rys. 3**).



Rys. 3. Lokalizacja genomowa i organizacja genetyczna regionów Pss w *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1. A) Regiony Pss-I, Pss-II oraz geny *pssAB* są sprzężone w chromosomowym regionie wielkości 200 kbp. Inne zidentyfikowane regiony Pss wykazują odległą lokalizację w chromosomie oraz na plazmidzie pRleTA1b. Organizacja genetyczna regionu Pss-I (B) vs. Pss-II (C): kod kolorystyczny podkreśla obecność w regionie

drugim genów kodujących kluczowe elementy systemu Wzx/Wzy-zależnego (pomarańczowy). Spośród nich, dotychczas charakteryzowano funkcjonalnie jedynie gen *pssP2*. Źródło: *Marczak i wsp. 2017*.

Interesujące było zatem badanie, czy region Pss-II jest związany z biosyntezą tego samego polisacharydu, czy też odpowiada za biosyntezę cząsteczki innego typu np. w innych warunkach.

Kopolimeraza polisacharydu jest białkiem, które bezpośrednio nie odpowiada za katalityczne łączenie ze sobą podjednostek oligocukrowych, ale jest niezbędna w biosyntezie i zaangażowana w regulację stopnia polimeryzacji łańcuchów egzopolisacharydów oraz łańcuchów O-swoistych LPS. W regionie Pss-I białko tego typu kodowane jest przez gen *pssP*. Gen *pssP2* zidentyfikowany w regionie Pss-II koduje hipotetyczne białko podobne do PssP i wykazujące szereg cech charakterystycznych dla kopolimeraz. Lokalny poziom identyczności/podobieństwa sekwencji aminokwasowej pomiędzy PssP2 i PssP wynosi 28%/47% w C-końcu PssP2 (258-554 aa) i 27%/45% w N-końcu PssP2 (16-251 aa); białka bardzo różnią się długością, a w dopasowaniu obecny jest duży indel w środkowej części sekwencji białka PssP. Spośród białek o znanych lub przewidywanych funkcjach najwyższe podobieństwo (zarówno na poziomie sekwencji aminokwasowej, jak i przewidywanej/potwierdzonej struktury drugo- i trzeciorzędowej) wykryto dla kinaz tyrozynowych zaangażowanych w regulację stopnia polimeryzacji polisacharydów (tzw. białka BYK, ang. *bacterial tyrosine kinases*) (*Grangeasse i wsp. 2012*).

Białko PssP2 prawdopodobnie nie występuje w znacznej ilości w komórkach RtTA1, a przynajmniej nie w warunkach rutynowej hodowli w podłożu pełnym lub minimalnym. Wskazuje na to brak aktywnego promotora przed genem *pssP2*. Transkrypcja genu *pssP2* odbywa się prawdopodobnie w układzie bicistronowym z poprzedzającym genem *pssY*, aczkolwiek aktywność promotora *pssY* w tych samych warunkach jest bardzo niska. Uszkodzenie genu *pssP2* spowodowane integracją plazmidu samobójczego w miejscu kodującym hipotetyczną domenę cytoplazmatyczną białka skutkowało zwiększeniem poziomu produkcji EPS, o zwiększonej masie cząsteczkowej polimerów w obydwu frakcjach, tj. HMW i LMW. W powiązaniu z tą zmianą, mutant wykazywał również zwiększoną autoagregację, podobnie jak szczep pozbawiony plazmidu pRleTA1b. Wykazałam, że białko PssP2 oddziałuje *in vivo* z kopolimerazą PssP, polimerazą PssT i glikozylotransferazą PssC zaangażowaną w syntezę oktasacharydowej podjednostki EPS.

W świetle tych wyników oczywistym stało się powiązanie funkcjonalne pomiędzy kopolimerazą polisacharydu kodowaną w regionie Pss-II a białkami kodowanymi w głównym regionie Pss-I. PssP2 mogłoby funkcjonować jako łącznik pomiędzy białkami odpowiedzialnymi za syntezę i transport podjednostki EPS (glikozylotransferazy/flipaza PssL), a białkami zawiadującymi polimeryzacją i eksportem polisacharydu (PssP, PssT, PssN). Dane wskazują, że białka PssP i PssP2 pełnią uzupełniające się role w syntezie frakcji HMW i LMW EPS, podobnie jak to ma miejsce w przypadku syntezy łańcuchów O-antygeny, gdzie również zaangażowane są dwie kopolimerazy (*Carter i wsp. 2009*). W takim kompleksie białko PssP prawdopodobnie odpowiada za regulację polimeryzacji łańcuchów frakcji HMW, zaś PssP2 - frakcji LMW. Skład kompleksu może być dynamiczny, a czynniki genetyczne i środowiskowe regulują ostateczną stechiometrię i wpływają na skład ilościowy poszczególnych frakcji w produkowanym egzopolisacharydzie. Pośrednim dowodem na słuszność tej hipotezy jest istotnie różny poziom ekspresji genów *pssP* i *pssP2* (mierzony aktywnością promotorów) w komórkach RtTA1, co może skutkować różnicami w oddziaływaniu z polimerazą PssT. Z danych literaturowych wynika, że sterując ilością białek polimerazy/kopolimerazy można wpływać na ilość i jakość produkowanego heteropolisacharydu (*Carter i wsp. 2009, Galvan i wsp. 2013*). Ustalenie funkcji pozostałych genów regionu Pss-II pozwoli poznać znaczenie obecności w genomie licznych podobnych genów zaangażowanych w ten sam szlak biosyntezy.

Powyższe wyniki opublikowano w pracy: ***Marczak M, Matysiak P, Kutkowska J, Skorupska A. 2014. PssP2 is a polysaccharide co-polymerase involved in exopolysaccharide chain-length determination in Rhizobium leguminosarum. PLoS One 9(9): e109106.***

Charakterystyczna proporcja frakcji nisko- i wysokocząsteczkowej polisacharydów jest jednym z elementów kształtujących specyficzność i efektywność oddziaływań bakterii z roślinnym lub zwierzęcym gospodarzem. W przypadku LPS różnych bakterii, każda z frakcji O-PS pełni określoną rolę biologiczną i angażuje podobne kopolimerazy, które współdziałają/konkurują ze sobą w obrębie kompleksu polimeryzacji. W przypadku egzopolisacharydu, przez wiele lat uważano, że LMW EPS pełni zasadniczą rolę sygnałową. Wykazano jednak, że mutanty *Sinorhizobium meliloti* nieprodukujące wykrywalnych ilości LMW EPS zakażają rośliny i z sukcesem wchodzi w symbiotyczną relację z rośliną (*Mendis i wsp. 2016*). Mutanty *R. leguminosarum* produkujące więcej HMW EPS są zaś bardziej

efektywne w symbiozie (Mazur i wsp. 2003, Marczak i wsp. 2014). Poziom ekspresji genów dla kopolimeraz polisacharydu koreluje ze zmianą masy cząsteczkowej polimerów. Wykazano, że jednym z elementów regulujących ekspresję odpowiednich genów w odpowiedzi na czynniki środowiskowe są metylotransferazy (Sarnacki i wsp. 2009) i białka regulatorowe, wpływające na aktywność transkrypcyjną genów poprzez metylację/demetylację w obrębie odpowiednich regionów promotorowych. W poszukiwaniu takich czynników genetycznych, które mogłyby regulować proces polimeryzacji EPS w *R. leguminosarum* skupiłam się na genie *mgl2*.

Metylotransferaza powiązana funkcjonalnie z polimeryzacją EPS i tworzeniem biofilmu

Gen *mgl2* zidentyfikowano na końcu regionu Pss-I, w pobliżu skupiska genów kodujących glikozylotransferazy i enzymy modyfikujące EPS podstawnikami niecukrowymi (**Rys. 1**). Gen zlokalizowany jest między genem *pssV* kodującym hipotetyczną kinazę z motywem AAK (ang. *amino acid kinase*), a genem *regA* kodującym hipotetyczne białko z domeną HTH, a więc prawdopodobnie zdolne do wiązania z DNA. Kontekst genomowy oraz istotne podobieństwo do metylotransferaz zależnych od S-adenozylometioniny (SAM) sugeruje, że Mgl2 jest tzw. metylotransferazą osamotnioną, niezwiązaną z systemem restrikcji-modyfikacji. Geny kodujące hipotetyczne białka o wysokim poziomie identyczności/podobieństwa zidentyfikowałam jedynie w *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *R. etli*. W chromosomach *R. etli* i *R. leguminosarum* bv. *trifolii* RtTA1 obecny jest paralog genu *mgl2*. W *R. etli* jest on powiązany z odległymi od Pss-I genami *celABCD* zaangażowanymi w biosyntezę celulozy, natomiast w szczepie TA1 jest zlokalizowany w pobliżu genów kodujących elementy systemu dwuskładnikowego. W *R. leguminosarum* bv. *viciae* jedyna kopia *mgl2* jest sprzężona z genami *celABCD*.

Duży region międzygenowy dzielony z transkrybowanym w przeciwną stronę genem *pssV* sugeruje złożoną regulację transkrypcji genu/genów *mgl2/pssV*. Promotor *mgl2* jest silny, a jego aktywność jest regulowana czynnikami środowiskowymi i zmienia się w zależności od składu podłoża hodowlanego. Struktura białka Mgl2 przewidziana dzięki modelowaniu homologicznemu wykazuje podobieństwo do metylotransferaz (MTaz) klasy I, dla których charakterystyczna jest obecność β -kartki otoczonej α -helisami (ang. *Rossmann fold*), z konserwatywnym motywem tworzącym miejsce wiązania SAM. Ustaliłam, że Mgl2

jest integralnym białkiem błonowym i ma zdolność tworzenia homooligomerów. Porównawcza analiza restrykcyjna DNA genomowego szczepu dzikiego i mutantu delecyjnego $\Delta mgl2$ z wykorzystaniem restryktaz, których aktywność jest modyfikowana metylacją DNA w obrębie sekwencji GATC lub motywu GANTC, nie potwierdziła, ale również nie wykluczyła jednoznacznie takiej aktywności metylazy DNA dla Mgl2 w komórkach szczepu TA1.

Delecja genu *mgl2* skutkowałą nadprodukcją EPS, w którym wyraźnie zaburzony został rozkład frakcji na korzyść łańcuchów o masach 7,4 - 125 kDa, czyli dużo krótszych niż we frakcji HMW szczepu dzikiego. Wprowadzenie do komórki genu *mgl2 in trans* spowodowało przywrócenie produkcji EPS o właściwym dla szczepu dzikiego rozkładzie frakcji. Wykazałam, że obserwowane zaburzenie nie wynikało ze zmiany poziomu ekspresji genów *pss*. Mutant wytwarzał mniej biofilmu w pełnym podłożu 79CA, ale jednocześnie w podłożu minimalnym biofilm był wyraźnie grubszy i bardziej zwarty. Dodatkowo, delecja genu *mgl2* korelowała z wyraźnie większą ruchliwością bakterii w podłożu minimalnym i mniejszą wrażliwością na deoksyholan sodu. Co ciekawe, wszystkie te zmiany fenotypowe nie wpłynęły niekorzystnie na właściwości symbiotyczne szczepu.

mgl2 pełni pośrednią lub bezpośrednią rolę w produkcji EPS, odpowiedzi na stres i ruchliwości. Jednakże zależności pomiędzy obserwowanymi fenotypami są złożone, nie wpisują się w znane mechanizmy (np. regulacji produkcji EPS) i dokładna funkcja białka pozostaje niewyjaśniona. Możliwe, że tak jak niektóre białka z domeną Rossmana, Mgl2 jest białkiem wiążącym SAM, ale nie ma aktywności (metylo)transferazowej (Kozbial i Mushegian 2005). Jednocześnie, lokalizacja genomowa *mgl2* i jego paralogu w sąsiedztwie genów kodujących hipotetyczne białka wiążące DNA i kinazy sugeruje rolę powiązaną z systemem dwuskładnikowym. Systemy takie powszechnie regulują takie procesy jak metabolizm azotu, produkcja polisacharydów i składanie rzęsek, a więc takie, których zaburzenia obserwuje się w mutancie $\Delta mgl2$. Badania są kontynuowane, aktualnie sprawdzane są konsekwencje delecji genu *pssV*; wstępne wyniki wskazują na powiązanie funkcjonalne genu *pssV* z sąsiadującym *mgl2*.

Omówione powyżej wyniki opublikowano w artykule: ***Marczak M, Żebracki K, Koper P, Turska-Szewczuk A, Mazur A, Wydrych J, Wójcik M, Skorupska A. 2019. Mgl2 is***

a hypothetical methyltransferase involved in exopolysaccharide production, biofilm formation and motility in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. MPMI. doi: 10.1094/MPMI-01-19-0026-R.

Co wiadomo o biosyntezie EPS w *Rhizobium leguminosarum*?

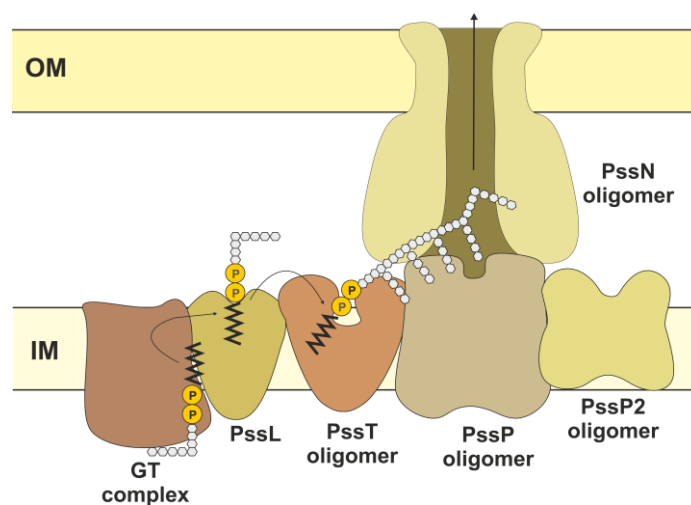
Egzopolisacharydy są syntetyzowane w szlaku określanym, jako Wzx/Wzy-zależny. Praca przeglądowa: **Marczak M, Mazur A, Koper P, Żebracki K, Skorupska A. 2017. Synthesis of Rhizobial Exopolysaccharides and Their Importance for Symbiosis with Legume Plants. Genes (Basel). 8(12):360. doi:10.3390/genes8120360**, podsumowuje najnowsze dane dotyczące sygnałowej roli egzopolisacharydu w nawiązywaniu efektywnej symbiozy, ale przede wszystkim zagadnienia związane z jego syntezą, obecnym stanem wiedzy o białkach zaangażowanych w Wzx/Wzy-zależną biosyntezę, polimeryzację i transport (egzo)polisacharydów, z uwzględnieniem badań bakterii modelowych, jak również wyników uzyskanych na modelu *Rhizobium leguminosarum* w naszej grupie.

Podsumowanie

1. Biosynteza egzopolisacharydu w *R. leguminosarum* odbywa się z udziałem produktów genów szlaku Wzx/Wzy-zależnego. W szczepie RtTA1 w produkcji EPS zaangażowane jest nietypowe **białko PssO unikalne dla wąskiej grupy rizobiów** i wykazujące niskie podobieństwo zarówno do znanych białek tego systemu, jak i innych o znanej strukturze/funkcji. **PssO jest eksportowane na powierzchnię komórki i jest niezbędne w produkcji EPS** - mutant delecyjny *pssO* nie produkuje egzopolisacharydu. PssO jest białkiem typu $\alpha+\beta$ i tworzy **co najmniej dimery**. Sieciowanie białek *in vivo* sugeruje również tworzenie przez PssO **struktur multimetrycznych**. Przepuszczalnie jest to cecha, która wiąże się z lokalizacją białka i umiarkowanym podobieństwem jego przewidywanej struktury trzeciorzędowej do **białek budujących fimbrie/pili**. Wyniki analizy dwuhybrydowej wskazują na **oddziaływanie PssO z zewnątrzblonową lipoproteiną PssN**. **Zwiększenie ruchliwości mutanta *pssO*** w minimalnym podłożu półpłynnym sugeruje, że chociaż zablokowana produkcja EPS jest głównym obserwowalnym defektem, jest to tylko jedna z wielu cech zmienionych w wyniku delecji genu. Niewykluczone, że taki fenotyp wynika ze

zmian w funkcjonowaniu układu chemotaksji, a to sugeruje powiązanie (pośrednie lub bezpośrednie) białka PssO z ruchliwością/chemotaksją.

2. Większość badanych **białek Pss RtTA1** ma właściwość tworzenia **homooligomerów**. Dotyczy to białka PssN (tetramer-oktamer), PssO (dimer-multimer), PssP (dimer-tetramer) oraz PssT (dimer). Na szczególną uwagę zasługuje jednak **sieć oddziaływań pomiędzy różnymi białkami systemu**. Wykazałam postulowane od dawna w literaturze **oddziaływanie między białkiem polimerazy (PssT) a kopolimerazą (PssP) (Rys. 4)**. **Mapowanie domen kluczowych dla oddziaływania PssT-PssP** wykazało obecność niezależnych domen dla polimeryzacji i oddziaływania z PssP w polimerazie oraz regulacji stopnia polimeryzacji i oddziaływań z polimerazą PssT w kopolimerazie. Dodatkowo rzuciło to nowe światło na zagadnienie produkcji frakcji nisko- i wysokocząsteczkowej EPS w szczepie dzikim i mutantach z uszkodzonym genem polimerazy lub kopolimerazy. W pracy po raz pierwszy z sukcesem **zastosowałam bakteryjny system dwuhybrydowy w analizie oddziaływań dużych, hydrofobowych białek błonowych**.



Rys. 4. Proponowany model topologii systemu transportu egzopolisacharydu w *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Model jest rezultatem kompilacji danych dotyczących białek systemu Wzx/Wzy-zależnego oraz danych eksperymentalnych zebranych na modelu *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Podjednostki oktasacharydowe są syntetyzowane na nośniku lipidowym przez glikozylotransferazy. Przedstawiono je jako pojedynczy blok, co zakłada istnienie kompleksu białkowego; nie wynika to jednak z dostępnych danych eksperymentalnych. Kompletne podjednostki są przenoszone do zewnętrznej warstwy IM przez flipazę PssL, a następnie polimeryzowane dzięki skoordynowanemu działaniu polimerazy PssT i oligomerycznej kopolimerazy PssP. Białka systemu współdziałają w złożonej sieci, gdzie kluczowe dla regulacji stopnia polimeryzacji i transportu EPS interakcje to: PssT-PssP i PssP-PssN. Kodowane w regionie Pss-II białko PssP2 stanowi dodatkowy element kompleksu i odmiennie niż PssP wpływa na długość łańcuchów EPS. Model nie uwzględnia lokalizacji i funkcji białek PssO i Mgl2. Źródło: *Marczak i wsp. 2017*.

3. Chociaż większość **kluczowych genów niezbędnych w syntezie, polimeryzacji i eksporcie EPS RtTA1 jest zlokalizowanych w chromosomie**, znaczący wpływ na produkcję EPS i innych polisacharydów oraz na funkcje z tym powiązane (tworzenie biofilmu, zdolność do agregowania czy ruchliwość) zależą od **genów zlokalizowanych w puli genomu dodatkowego, czyli na plazmidach**. W szczepie RtTA1 kluczowe okazały się geny zlokalizowane na plazmidzie pRleTA1b (w którym zidentyfikowano region Pss-III), bez którego komórki wykazują szereg defektów metabolicznych, **zwiększoną autoagregację** przy jednoczesnym **zmniejszeniu ilości tworzonego biofilmu** (podobnie jak delecje fragmentów plazmidu pRleTA1a). Genomy rizobiów są duże i plastyczne. Wykazują **nadmierność** homologicznych genów zaangażowanych w podobne, lub te same szlaki metaboliczne, np. **syntezę polisacharydów**. Oznacza to, że sieć powiązań funkcjonalnych między poszczególnymi replikonami jest bardzo złożona i odzwierciedla różnorodność i dynamikę środowisk, w których bytują rizobia.

4. Wśród genów kodujących hipotetyczne białka zaangażowane w biosyntezę zewnątrzkomórkowych polisacharydów **rozsianych w genomie poza głównym regionem Pss-I**, obecne są geny kodujące **paralogi systemu Wzx/Wzy-zależnego**. Wykazałam, że w **regionie Pss-II** oddalonym o 200 kpz od regionu Pss-I kodowane są dodatkowe **elementy systemu polimeryzacji i regulacji stopnia polimeryzacji EPS (Rys. 3)**. Białko PssP2 wykazuje szereg cech **kopolimeraz** polisacharydu i uczestniczy w **regulacji stopnia polimeryzacji EPS** w RtTA1. PssP2 tworzy **homooligomery** oraz **oddziałuje z kopolimerazą PssP i polimerazą PssT**, a fenotyp mutanta i komplementanta *pssP2* wskazuje, że dwie, różniące się topologią kopolimerazy mogą pełnić w takim kompleksie przeciwstawne, ale uzupełniające się role: **kopolimerazy frakcji LMW (PssP2) i frakcji HMW (PssP) (Rys. 4)**.

5. Z **polimeryzacją egzopolisacharydu** w RtTA1 ma związek białko **Mgl2 o hipotetycznej aktywności metylotransferazy**. Według danych literaturowych metylacja DNA jest mechanizmem epigenetycznym zaangażowanym w regulację ekspresji genów biosyntezy polisacharydów w *Enterobacteriaceae*. Zidentyfikowana w RtTA1 **hipotetyczna metylotransferaza Mgl2 (lub białko zdolne do wiązania SAM)** jest białkiem **unikalnym dla wąskiej grupy blisko spokrewnionych rizobiów** (podobnie jak PssO) o przewidywanej

strukturze charakterystycznej dla metylotransferaz klasy I. Gen *mgl2* ma swój **paralog w oddalonej lokalizacji w chromosomie** i wykazuje zmienną lokalizację genomową w spokrewnionych szczepach. Kontekst genomowy sugeruje jednak udział *mgl2* w biosyntezie EPS/celulozy i/lub (dwuskładnikowym) systemie regulacyjnym. Wykazałam, że **Mgl2 tworzy dimery i jest integralnym białkiem błony wewnętrznej**. Niewykluczone, że wpływ **delecji *mgl2* na istotne zmniejszenie stopnia polimeryzacji EPS** jest efektem pośrednim. Jednak fakt, że mutacja **zwiększa również ruchliwość** szczepu i **zdolność do tworzenia biofilmu** w ubogim podłożu sugeruje rolę regulatorową na styku różnych powiązanych ze sobą szlaków metabolicznych.

Literatura

Becker A (2015) Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol*, 6: 687.

Schmid J, Sieber V, Rehm B (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*, 26; 6:496.

Islam ST, Lam JS (2014) Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can J Microbiol*, 60: 697-716.

Robertson BK, Aman P, Darvill AG, McNeil M, Albersheim P (1981) Host-symbiont interactions. V. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol*, 67:389-400.

O'Neill MA, Darvill AG, Albersheim P (1991) The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. *J Biol Chem*, 266: 9549-9555.

Król JE, Mazur A, Marczak M, Skorupska A (2007) Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*, 89: 237-247.

Grangeasse C, Nessler S, Mijakovic I (2012) Bacterial tyrosine kinases: evolution, biological function and structural insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367(1602):2640-2655.

Marolda CL, Tatar LD, Alaimo C, Aebi M, Valvano MA (2006) Interplay of the Wzx translocase and the corresponding polymerase and chain length regulator proteins in the translocation and periplasmic assembly of lipopolysaccharide o antigen. *J Bacteriol*, 188: 5124-5135.

Nath P, Morona R (2015) Detection of Wzy/Wzz interaction in *Shigella flexneri*. *Microbiology*, 161: 1797-1805.

Mazur A, Król JE, 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.

Mazur A, Król JE, 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.

Morona R, Purins L, Tocilj A, Matte A, Cygler M (2009) Sequence-structure relationships in polysaccharide copolymerase (PCP) proteins. *Trends Biochem Sci*, 34: 78-84.

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

Islam ST, Gold AC, Taylor VL, Anderson EM, Ford RC, Lam JS (2011) Dual conserved periplasmic loops possess essential charge characteristics that support a catch-and-release mechanism of O-antigen polymerization by Wzy in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Biol Chem*, 286: 20600–20605.

Mazur A, Koper P (2012) Rhizobial plasmids - replication, structure and biological role. *Central European Journal of Biology* 7: 571-586.

Carter JA, Jimenez JC, Zaldivar M, Alvarez SA, Marolda CL, et al. (2009) The cellular level of O-antigen polymerase Wzy determines chain length regulation by WzzB and WzzpHS-2 in *Shigella flexneri* 2a. *Microbiology* 155: 3260–3269.

Galvan EM, Ielmini MV, Patel YN, Bianco MI, Franceschini EA, et al. (2013) Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. *Glycobiology* 23: 259–272.

Mendis HC, Madzima TF, Queiroux C, Jones KM (2016) Function of Succinoglycan Polysaccharide in *Sinorhizobium meliloti* Host Plant Invasion Depends on Succinylation, Not Molecular Weight. *mBio*, 7(3), e00606–16.

Sarnacki SH, Marolda CL, Noto Llana M, Giacomodonato MN, Valvano MA, Cerquetti MC (2009) Dam methylation controls O-antigen chain length in *Salmonella enterica* serovar enteritidis by regulating the expression of Wzz protein. *J. Bacteriol*. 191:6694-6700.

Kozbial PZ, Mushegian AR (2005) Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct. Biol*. 5:19.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Aktywność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

Pracę naukową rozpoczęłam w trakcie studiów na kierunku "Biotechnologia" w latach 1997-2002 w grupie Prof. dr hab. Anny Skorupskiej. Tematem mojej pracy magisterskiej była analiza struktury drugorzędowej i topologii błonowej białek PssT oraz PssN szczepu RtTA1. Skonstruowałam serię plazmidów kodujących białka hybrydowe, w których badane białka PssT/N tworzyły fuzje translacyjne z białkami reporterowymi PhoA (alkaliczna fosfataza) lub LacZ (β -galaktozydaza). Punktem wyjścia dla zaplanowania miejsc fuzji było szczegółowe przewidywanie *in silico* struktur drugorzędowych i topologii białek. Badanie immunochemiczne potwierdziło, że przewidywane białka hybrydowe były produkowane w *E. coli*, a wyniki pomiarów aktywności alkalicznej fosfatazy i β -galaktozydazy w białkach fuzyjnych potwierdziły słuszność skonstruowanych modeli topologicznych. Według tych modeli PssT jest wysoce hydrofobowym białkiem zakotwiczonym w błonie wewnętrznej 12 segmentami transbłonowymi, a PssN - białkiem wyprowadzanym z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej, ale o nieokreślonej topologii i lokalizacji komórkowej. Zbadano również wpływ mutacji w genie *pssT* na biosyntezę EPS. Wykazano, że skrócenie białka o kilkaset aminokwasów na C-końcu w obrębie największej zidentyfikowanej pętli peryplazmatycznej skutkowało produkcją EPS o większym udziale frakcji HMW, w której łańcuchy miały dodatkowo większą masę cząsteczkową niż w szczepie dzikim.

Wyniki opublikowano w pracy: *Mazur A, Król JE, 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.*

Po ukończeniu studiów biotechnologicznych w 2002 roku zostałam zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (dziś: Zakład Genetyki i Mikrobiologii) na stanowisku asystenta w grupie Prof. dr hab. Anny Skorupskiej. Kontynuowałam badania w zakresie funkcjonalnej charakterystyki białek kodowanych w regionie Pss-I. Zdobyta wiedza i pierwsze doświadczenia w pracy naukowej nad białkami związanymi z transportem związków cukrowych w rizobiach zaowocowały pracą przeglądową: *Marczak M, Mazur A,*

Skorupska A. 2003. Bakteryjne systemy transportu cukrów. Postępy Biochemii 49(4): 278-289.

W tym samym czasie w regionie Pss-I zidentyfikowano gen *pssL* kodujący wysoce hydrofobowe białko, którego przewidywana topologia przypominała topologię PssT. PssL uznano pierwotnie za alternatywny dla PssT transporter EPS w *R. leguminosarum*. Dopiero szczegółowa analiza struktury drugorzędowej, podobieństwa białka oraz szczególnych cech sekwencji aminokwasowej w połączeniu z cechami modelu topologicznego, pozwoliły przypisać białku prawdopodobną funkcję flipazy typu Wzx (rodzina białek PST, ang. *polysaccharide transporter*), drugiego charakterystycznego elementu systemu biosyntezy i polimeryzacji heteropolisacharydów i antygenów O-swoistych, zależnego od białek Wzy i Wzx. W tym przypadku pierwsze realizowane przeze mnie zadania badawcze polegały na konstrukcji mutantu w genie *pssL* oraz badaniu topologii białka z wykorzystaniem fuzji translacyjnych *pssL-phoA/lacZ*. Opracowany na podstawie analiz *in silico* model topologii PssL znalazł swoje potwierdzenie w wynikach badania aktywności enzymów reporterowych oraz badaniu immunochemicznym. Ustaliłam, że PssL ma 12 TMS, obydwie końce białka zlokalizowane są w cytoplazmie, zaś między TMS6-TMS7 obecna jest duża pętla cytoplazmatyczna. Wykazano również, że w warunkach standardowej hodowli promującej produkcję EPS (w wysokoenergetycznym podłożu 79CA) gen *pssL* jest wyrażany na kilkukrotnie niższym poziomie niż gen *pssT*.

Wyniki badań opublikowano w pracy: **Mazur A, Marczak M, Król JE, Skorupska A. 2005. Topological and transcriptional analysis of *pssL* gene product: a putative Wzx-like exopolysaccharide translocase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TAI. Arch. Microbiol. 184: 1-10.**

Równocześnie prowadzono badania, których celem było ustalenie: a) jakie czynniki i w jakim zakresie wpływają na ekspresję genów *pss*; b) czy geny *pss* są wyrażane *in planta*; c) oraz jak mutacje w genach kodujących białka zaangażowane w biosyntezę EPS i skutkujące zmianami ilości/lepkości EPS wpływają na fenotyp symbiotyczny i inne cechy rizobiów.

Udowodniono, że poziom ekspresji genów *pssO* i *pssP* jest znacząco różny i w różnym stopniu wzrasta w obecności fosforanów, jonów amonowych i flawonoidów. Zależność od flawonoidów i białka NodD oznacza regulację biosyntezy EPS zależną od

czynników determinujących odpowiedź bakterii symbiotycznych na wydzieliny kompatybilnych roślin bobowatych. Zmiana poziomu ekspresji genów *pss* zaangażowanych na różnych etapach syntezy EPS w zależności od zmieniającej się dostępności azotu lub fosforanów, wiązałyby się ze zmianami ilości/jakości produkowanego egzopolisacharydu, a to z kolei mogłoby pełnić swoistą rolę np. przy przejściu ze stanu saprofitycznego w glebie do symbiotycznego wewnątrz rośliny.

Szczegółowe badania fenotypowe mutantów w genach *pss* dostarczyły informacji na temat roli sygnałowej/ochronnej form LMW/HMW egzopolisacharydu wytwarzanego przez szczep dziki RtTA1 oraz o powiązaniach szlaku biosyntezy EPS z biosyntezą lipopolisacharydu. Mutacje w genach *pss* działają plejotropowo. Mutanty, albo nie zasiedlają brodawek, albo zasiedlają tylko młodsze strefy i indukują większy poziom odpowiedzi stresowej koniczyny. Mutacje *pss* powodują zmiany we wrażliwości na detergenty, etanol czy antybiotyki, co wskazuje na zaburzenie integralności osłon komórkowych, których EPS jest częścią. Na powiązanie różnych szlaków komórkowych wskazuje plejotropowy efekt mutacji w genie kodującym glikozylotransferazę PssD, która skutkuje zarówno zablokowaną biosyntezą EPS, jak i zaburzeniem struktury LPS.

Wyniki powyższych badań opublikowano w pracach:

Wielbo J, Mazur A, Król JE, Marczak M, Skorupska A. 2004. Environmental modulation of the *pssTNOP* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 50: 201-211.

Wielbo J, Mazur A, Król JE, 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.

Wyniki badań funkcji genów *pss* RtTA1 podsumowano na tle danych dotyczących biosyntezy EPS w modelowej bakterii *S. meliloti* oraz fragmentarycznych danych o biosyntezie w *R. leguminosarum* w pracy przeglądowej:

Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J. 2006. *Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microb. Cell Fact. 5:7. doi:10.1186/1475-2859-5-7.*

Przedmiotem badań w naszej grupie jest nie tylko genetyczna kontrola biosyntezy EPS. Jeden z nurtów badawczych realizowanych w naszym zespole obejmuje również badanie organizacji genomu *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, analizę puli plazmidowego DNA i tego, w jaki sposób kształtuje ona potencjał metaboliczny rizobiów.

Wykazano, że genom szczepu RtTA1 składa się z chromosomu i czterech megaplazmidów, a całkowitą wielkość genomu oszacowano na 7257 ± 8 kpz. Zidentyfikowano fragmenty restrykcyjne należące do poszczególnych plazmidów, uporządkowano fragmenty chromosomu i sporządzono mapę fizyczną i genetyczną genomu RtTA1, na której zlokalizowano ponad 100 markerów genetycznych. Porównanie skonstruowanej mapy z genomami *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 oraz *R. etli* CFN42 wykazało, że mimo znacznego podobieństwa i kolinearności chromosomów, wyraźnie różna jest dystrybucja materiału genetycznego w obrębie puli plazmidowej. Takie porównanie jest szczególnie ciekawe ze względu na dużą niestabilność i plastyczność genomów rizobiów.

W klonach biblioteki genomowej RtTA1 skonstruowanej w sztucznym chromosomie bakteryjnym (BAC) zidentyfikowano 5 dużych zgrupowań genów zaangażowanych w syntezę powierzchniowych polisacharydów (Pss-I – Pss-V), a także kilkanaście genów rozproszonych w genomie i nietworzących większych zgrupowań. Zidentyfikowano wiele paralogów, głównie w genach biosyntezy polisacharydów (np. *pssP* i *pssP2*, *pssA* i *pssA2*), oraz w genach symbiotycznych (np. *fixGHI*). Największy zidentyfikowany region Pss-I (33,7 kpz) jest zlokalizowany w chromosomie i zawiera 24 geny, z których większość to geny wcześniej opisane przez nas: *pssT*, *pssNOP*, *prsDEorf3*, *pssCDE* oraz *pssL*, lub przez innych autorów.

Opisane powyżej badania opublikowano w trzech artykułach:

Skorupska A, Król J, Mazur A, Marczak M. 2008. *Genomika Rhizobium leguminosarum – badanie genów syntezy polisacharydów powierzchniowych (Genomic approach to study surface polysaccharide genes in Rhizobium leguminosarum). Biotechnologia 2(81): 27–40.*

Król JE, 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.

Król JE, Mazur A, Marczak M, Skorupska A. 2007. Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics* 89: 237–247.

Tematem przewodnim mojej pracy doktorskiej była charakterystyka białek PssN i PssO *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. PssN jest białkiem powszechnie występującym w różnych szczepach rizobiów, na co wskazuje obecność białek o podobnej masie cząsteczkowej immunoreaktywnych z surowicą anti-PssN. Spektroskopia FTIR białka rekombinowanego PssN-His₆ wykazała, że PssN jest w głównej mierze złożone ze struktur drugorzędowych typu β -kardki (43%), natomiast α -helisy stanowią ~15%. N-koniec jest peptydem sygnałnym, który kieruje PssN do peryplazmy, a białko jest modyfikowane z utworzeniem lipoproteiny i kierowane do błony zewnętrznej. Metodą porównawczego trawienia proteazami oraz immunofluorescencji pośredniej komórek i sferoplastów RtTA1 wykazano, że większa część homooligomeru PssN zlokalizowana jest w przestrzeni peryplazmatycznej. Zwiększona synteza PssN korelowała ze zwiększoną ilością EPS wydzielaną do podłoża hodowlanego. Jest to jedyny, chociaż pośredni dowód udziału białka PssN w tym procesie, ponieważ próby skonstruowania mutantu delecyjnego w tym genie nie powiodły się.

Wyniki prezentowano na konferencjach i opublikowano w pracy, nagrodzonej w 2007 r. przez Komitet Mikrobiologii PAN: **Marczak M, Mazur A, Król JE, Gruszecki WI and Skorupska A. 2006. Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: subcellular localization and possible involvement in exopolysaccharide export. *J. Bacteriol.* 188: 6943–6952.**

Praca była pierwszym tego typu doniesieniem dotyczącym białka typu OMA (ang. *Outer Membrane Auxiliary*) w rizobiach; dotychczas o lokalizacji i funkcji hipotetycznych białek OMA w innych rizobiach wnioskowano tylko na podstawie analiz *in silico*. W powiązaniu z wynikami analizy funkcjonalnej białek PssT, PssL i PssP praca ta wyznaczyła kierunki dalszych moich badań po uzyskaniu stopnia doktora, których nadrzędnym celem było zrozumienie, jak opisane białka współdziałają ze sobą w syntezie/sekrecji EPS i jakie

czynniki wpływają na te interakcje skutkując zmianą ilościową/jakościową produkowanego EPS.

Badania białka PssO rozpoczęto przed uzyskaniem stopnia doktora, ale kontynuowano po jego uzyskaniu, czego efektem była praca: *Marczak i wsp. (2008)*, omówiona w **części 4c**.

5.2. Praca naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych od 1 października 2008 r. zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, w którym pracuję do dnia dzisiejszego. Kontynuowałam interesującą mnie tematykę związaną z biosyntezą egzopolisacharydu. Główny nurt stanowiły badania kluczowych elementów kompleksu białek odpowiedzialnego za biosyntezę i polimeryzację EPS, tj. PssO, PssP, PssT, PssN i PssL. Wyniki tych badań opisano w **części 4c**. Uczestniczyłam także w badaniach dotyczących biologii plazmidów oraz genetycznej determinacji biosyntezy LPS. Oprócz tego, w ramach współpracy z Uniwersytetem Medycznym, uczestniczyłam w realizacji projektów dotyczących związku między polimorfizmem wybranych SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*), a predyspozycjami do wystąpienia objawów wypadania narządów miednicy mniejszej oraz wysiłkowego nietrzymania moczu u kobiet.

5.2.1 Badania asocjacyjne

W ramach współpracy naukowej z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie realizowałam badania molekularne w dwóch projektach, których celem było zweryfikowanie powiązania między występowaniem określonych genotypów SNP a predyspozycjami do wystąpienia zaburzeń statyki dolnego odcinka układu moczopłciowego i nietrzymania moczu u kobiet. W pierwszym projekcie analizowano polimorfizmy PCR-RFLP w genach kodujących białka tkanki łącznej oraz enzymy zaangażowane w jej remodelowanie (COL1A1, MMP-1, MMP-3). Uzyskano wyniki potwierdzające powiązanie kombinacji genotypów 1G/2G w genie MMP-1/ 5A/6A w promotorze genu MMP-3 z istotnie częstszym występowaniem tych zaburzeń. W drugim przypadku badano zmienność w genach kodujących receptory estrogenowe (ESR-1, ESR-2), monoooksygenazę steroidową (CYP17),

aromatazę (CYP19) i receptor serotoninowy (5-HT2A) w powiązaniu z predyspozycjami do wystąpienia nietrzymania moczu. Materiał zebrany w ostatnim projekcie posłużył również w meta-analizie typu GWAS (ang. *genome-wide association study*) dla ponad 9 mln wariantów genetycznych, realizowanej w ramach współpracy międzynarodowej. Badane grupy pacjentek pochodziły z Polski i innych krajów europejskich. W toku realizacji tego projektu wykazano asocjację dwóch loci: w pobliżu genu EDN1, kodującego endotelinę 1, peptyd o właściwości zwężania naczyń krwionośnych, oraz genu MARCO, kodującego białko receptorowe makrofagów wiążące bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne (ang. *macrophage receptor with collagenous structure*) z występowaniem naglącego nietrzymania moczu. Wynikiem tych badań są doniesienia konferencyjne oraz dwa artykuły (jeden jest aktualnie recenzowany):

Skorupski P, Jankiewicz K, Miotła P, Marczak M, Kulik-Rechberger B, Rechberger T. 2013. The polymorphisms of the MMP-1 and the MMP-3 genes and the risk of pelvic organ prolapsed. Int Urogynecol J. 24:1033-1038.

**** Rufus Cartwright, Larissa Franklin, Kari A.O. Tikkinen, Ilkka Kalliala, Pawel Miotla, Tomasz Rechberger, (...), Malgorzata Marczak, Phil Bennett, Vik Khullar, Marjo-Riitta Järvelin, and Andrew Walley on behalf of the IGNITE Consortium. Genome wide association study identifies two novel loci associated with female stress and urgency urinary incontinence.***

** artykuł jest w recenzji*

5.2.2. Badania funkcjonalne systemów replikacji/partycji plazmidów RtTA1

Drugi nurt badawczy stanowił kontynuację podjętych wcześniej badań genomu *R. leguminosarum*, dotyczących biologii plazmidów rizobiów. Ze względu na rolę, jaką plazmidy spełniają w komórkach rizobiów, badania nad ich replikacją, stabilnym utrzymaniem oraz aktywną segregacją mają szczególną wagę. Plazmidy rizobiowe są niskokopijne, co wymaga obecności ściśle kontrolowanych systemów partycyjnych pozwalających na stabilne dziedziczenie. Geny kodujące poszczególne białka odpowiedzialne za proces partycji, jak również tzw. sekwencje centromero-podobne są zazwyczaj

zlokalizowane w jednym operonie razem z genem dla białka inicjującego proces replikacji plazmidu. Są to tzw. kasety *repABC*, powszechnie występujące w plazmidach bakterii z rodzaju *Rhizobium* i *Agrobacterium*. Badania prowadzone w naszym zespole wykazały, że każdy z czterech plazmidów szczepu RtTA1 jest wyposażony w funkcjonalny system *repABC*. Podjęto problem zbadania mechanizmów, które umożliwiają zgodną koegzystencję w jednej komórce bakteryjnej kilku megaplazmidom wyposażonym w podobne kasety replikacji/partycji.

Potwierdzono, że geny *repABC* czterech plazmidów RtTA1 tworzą operony, ale wykazują różnice w poziomie ekspresji. W regulacji ekspresji genów poszczególnych operonów uczestniczą białka RepA i RepB. Białka RepA wiążą się z DNA, przy czym ATP stymuluje wiązanie niespecyficzne, zaś w obecności ADP następuje specyficzne związanie z właściwym operatorem i autorepresja. Wykazano, że każde białko RepA wiąże się specyficznie tylko z operatorem własnej kasety *repABC*. Białka RepA oligomeryzują *in vitro* w sposób zależny od ATP/ADP, ale różnią się kinetyką i profilem oligomeryzacji. Wykazano, że białka RepA i RepB oddziałują ze sobą *in vivo*. Białka RepA/RepB razem z centromeropodobnymi sekwencjami *parS* stanowią system partycyjny plazmidów, podczas gdy białko RepC jest niezbędne i wystarczające w replikacji. Podobnie jak RepA, białka RepB wiążą specyficznie sekwencje, tj. centromeropodobne motywy *parS* swojego plazmidu i nie obserwuje się wiązania krzyżowego z sekwencjami *parS* któregośkolwiek z trzech pozostałych plazmidów. RepB tworzy dimery i oligomery wyższego rzędu, przy czym domena odpowiedzialna za dimeryzację jest zlokalizowana w części C-końcowej białka, zaś domena wiążąca DNA w części centralnej polipeptydu.

Te wielokierunkowe badania czterech replikonów wykazały, jak precyzyjnie regulowany jest rozdział do komórek potomnych, kilku plazmidów wyposażonych w ten sam system partycyjny. Jest to możliwe dzięki wysoce specyficznym interakcjom między białkami partycyjnymi a sekwencjami DNA, w połączeniu z wystarczającym poziomem ich zróżnicowania w identycznym schemacie organizacyjnym kasety typu *repABC*. Wyniki powyższych badań opisano w pracach:

Koper P, Żebracki K, Marczak M, Skorupska A, Mazur A. 2016. RepB proteins of the multipartite Rhizobium leguminosarum bv. trifolii genome discriminate between

centromere-like pars sequences for plasmid segregational stability. Molecular Microbiology, 102: 446-466.

Żebracki K, Koper P, Marczak M, Skorupska A, Mazur A. 2015. Plasmid-Encoded RepA Proteins Specifically Autorepress Individual repABC Operons in the Multipartite Rhizobium leguminosarum bv. trifolii Genome. PLoS One 10(7): e0131907.

5.2.3. Badania funkcjonalne genów determinujących syntezę/modyfikację LPS w *Mesorhizobium loti*

Lipopolisacharydy są unikalnym składnikiem komórek bakterii Gram-ujemnych i stanowią zewnętrzną warstwę błony zewnętrznej (OM). Bakterie, których LPS jest zbudowany z: lipidu A, oligosacharydu rdzeniowego oraz O-polisacharydu (O-antygeny) to tzw. gładkie bakterie. Formy szorstkie nie mają O-antygeny w LPS. Hydrofilowy łańcuch O-swoisty ma bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i stanowi barierę ochronną dla bakterii przed układem dopełniacza, fagocytozą lub wybuchem tlenowym wewnątrz eukariotycznego gospodarza. Badania potwierdzają, że odpowiednia ilość HMW-LPS w błonie zewnętrznej bakterii jest niezbędna w inwazji oraz zdolności przetrwania w symbiotycznych i pasożytniczych relacjach z roślinami, zwierzętami i pierwotniakami (podobnie do HMW EPS – omówione w części 4c).

We wcześniejszych badaniach zidentyfikowano i scharakteryzowano chemicznie mutantą transpozonoowego *Mesorhizobium loti* NZP2213, w którym wykazano obecność dwukrotnie mniejszej ilości O-PS, w którym łańcuchy O-swoiste wykazywały zmniejszony poziom O-acetylowania. Ustalono, że miejsce integracji transpozonu to gen kodujący hipotetyczną O-acetylotransferazę. Sklonowałam gen *oatB* z *M. loti* NZP2213 i zdeponowałam jego sekwencję w GeneBank (MH626640). Następnie skonstruowałam plazmid niosący gen *oatB* i wprowadziłam go do komórek mutanty. Połączone dane ze spektroskopii ¹H NMR i testów wrażliwości na faga A1 potwierdziły przywrócenie funkcji O-acetylotransferazy w szczepie komplementanta, potwierdzając tym samym przewidywaną funkcję genu *oatB*. Okazało się, że zmiana właściwości osłon komórkowych w *M. loti* spowodowana uszkodzeniem genu *oatB*, wpływa na przeżywalność bakterii w komórkach *Acanthamoeba castellanii* sprawiając, że stają się one podatne na stres nitrozacyjny i/lub

działanie peptydów kationowych i/lub enzymów litycznych tych pierwotniaków. Badania te opisano w pracy:

Karaś MA, Turska-Szewczuk A, Marczak M, et al. 2018. A Mutation in the Mesorhizobium loti oatB Gene Alters the Physicochemical Properties of the Bacterial Cell Wall and Reduces Survival inside Acanthamoeba castellanii. Int J Mol Sci. 19(11): 3510.

PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

1. Mój całkowity dorobek naukowy obejmuje współautorstwo 20 prac, z których 18 opublikowano w czasopismach z bazy JCR.
2. Dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora to współautorstwo w 10 pracach opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, z czego w 5 pracach jestem pierwszym autorem (w tym w 4 autorem korespondencyjnym).
3. Jestem współautorem 4 prac przeglądowych (1 po doktoracie) oraz 44 komunikatów zjazdowych (26 po doktoracie), wśród których 29 było prezentowanych na konferencjach międzynarodowych.
4. Liczba cytowań wszystkich prac wg bazy Web of Science (stan na 27.03.2019r.) wynosi 295 (248 bez autocytowań). Prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora były cytowane 52 razy (45 bez autocytowań).
5. Podsumowanie danych bibliometrycznych:

<i>Artykuły</i>	<i>IF zgodny z rokiem opublikowania</i>	<i>Punkty MNiSW wg roku publikacji</i>	<i>Punkty MNiSW wg wykazu z 25 stycznia 2017r.</i>
Opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora:	23,606	161	223
- lista JCR	23,606	153	205
- poza listą JCR	-	8	18
Opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora:	33,019	348	335
- stanowiące osiągnięcie naukowe	17,250	170	170
- niewłączone do osiągnięcia naukowego	15,769	178	165
SUMA	56,625	509	558

PLANY NA PRZYSZŁOŚĆ

W ramach interesujących mnie badań asocjacyjnych uczestniczę obecnie w projekcie, którego celem jest **weryfikacja powiązań między stężeniem witamy D, a polimorfizmem genetycznym w obrębie genu VDR kodującego jej receptor oraz wystąpieniem problemów w gospodarce wapniowo-fosforanowej i stanem układu kostnego u dzieci do pierwszego roku życia**. W ramach tego projektu zaplanowałam molekularną część eksperymentalną i jestem jej wykonawcą.

Obecnie jestem **kierownikiem** grantu naukowego realizowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, 2017/27/B/NZ9/01849 pt. "Kompleks enzymatyczny glikozylotransferaz *Rhizobium leguminosarum* jako model bakteryjnego szlaku biosyntezy egzopolisacharydu" (2018-2021). Głównym celem naukowym projektu jest opracowanie kompleksowego modelu funkcjonowania szlaku biosyntezy egzopolisacharydu poprzez rozszerzenie dotychczasowych badań o wielokierunkową analizę funkcjonalną glikozylotransferaz (GT) zaangażowanych w składanie podjednostki EPS. Badania genetyczne i strukturalne, jak również wyniki uzyskane przeze mnie, wskazują, że białka odpowiedzialne za polimeryzację i translokację polisacharydów oddziałują ze sobą. Dotychczas nie analizowano jednak relacji między glikozylotransferazami oraz GT a pozostałymi białkami zaangażowanymi w syntezę i transport EPS. W przypadku glikozylotransferaz, zgromadzone dotychczas dane są fragmentaryczne i w większości ograniczają się do potwierdzenia udziału w biosyntezie EPS lub przypisania funkcji na podstawie podobieństwa sekwencji. **Projekt zakłada wielokierunkową charakterystykę glikozylotransferaz kodowanych w chromosomalnym regionie Pss-I, głównym skupisku genów biosyntezy EPS w *R. leguminosarum*. Założeniem jest rozpoznanie zależności funkcjonalnych i strukturalnych między glikozylotransferazami odpowiedzialnymi za biosyntezę podjednostki EPS w RtTA1.** Zadania będą realizowane na wielu poziomach: od badania organizacji transkrypcyjnej genów i wpływu czynników środowiskowych na ich wyrażanie, poprzez konstrukcję mutantów i badanie wpływu na biosyntezę/polimeryzację EPS, do badania oddziaływań między białkami i próby zrekonstruowania potencjalnego kompleksu białkowego glikozylotransferaz, którego istnienie postulowano wielokrotnie w literaturze.

W ramach badań wstępnych finansowanych przez NCN w konkursie MINIATURA 1 (2017-2018) uzyskałam wyniki, które stanowią cenny materiał do przygotowania wniosku grantowego poświęconego badaniu **zjawiska fosforylacji białek w kontekście biosyntezy egzopolisacharydu *R. leguminosarum***. Z dotychczasowych badań fosforylacji białek w bakterii wyłania się obraz złożonych strategii regulacyjnych, angażujących kinazy histydynowe, białka o charakterze kinaz/fosfataz tyrozynowych oraz kinazy/fosfatazy serynowo/treoninowe. Dane literaturowe oraz uzyskane przeze mnie wyniki potwierdzają, że pewne białka związane z syntezą EPS są fosforylowane. Planuję przygotowanie nowego wniosku projektowego. Jego celem badawczym będzie **powiązanie mechanizmu składania podjednostek EPS i ich polimeryzacji z endo- i egzogennymi czynnikami, które mogą wpływać na ekspresję białek Pss i dynamikę fosfoproteomu związanego z biosyntezą egzopolisacharydu w rizobiach**.

Maryzokata Marnech