

AUTOREFERAT

1. Imię i nazwisko.

Łukasz Dziewit

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.

- Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany uchwałą Rady Naukowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego dnia 12.10.2009. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Genomika strukturalna i funkcjonalna plazmidów bakterii metylotroficznej *Paracoccus aminophilus* JCM 7686”. Promotorem w przewodzie doktorskim był dr hab. Dariusz Bartosik, prof. UW (Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski), a recenzentami: prof. dr hab. Grażyna Jagura-Burdzy (Instytut Biochemii i Biofizyki, Polska Akademia Nauk) oraz prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn (Katedra Biologii Molekularnej; Wydział Biologii; Uniwersytet Gdański).

Rozprawa doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Wydziału Biologii UW. Ponadto, została ona wyróżniona nagrodą indywidualną II stopnia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcie naukowe.

- Tytuł magistra biotechnologii w zakresie mikrobiologii (dyplom z wyróżnieniem) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego 29.06.2005. Tytuł pracy magisterskiej: „Identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna systemu stabilizującego *tad-ata* z plazmidu pAMI2 *Paracoccus aminophilus*”. Opiekunem pracy był dr Dariusz Bartosik.
- Tytuł licencjata biotechnologii w zakresie mikrobiologii (dyplom z wyróżnieniem) uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego 25.06.2003. Tytuł pracy licencjackiej: „Poszukiwanie integronów w genomach bakterii glebowych z rodzaju *Paracoccus*”. Opiekunem pracy była dr Jadwiga Baj.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 01.12.2009 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Genetyki Bakterii Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- 01.10.2005-12.10.2009: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Dariusza Bartosika.
- 01.10.2003-29.06.2005: studia magisterskie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- 01.10.2000-25.06.2003: studia licencjackie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

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. nr 65, poz. 595 ze zm.).

a) Tytuł osiągnięcia naukowego.

Ruchome elementy genetyczne i ich rola w adaptacji bakterii do środowisk ekstremalnych.

b) *Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, ze szczegółowym omówieniem indywidualnego wkładu wnioskodawcy.*

- i. **Dziewit L.**, A. Pyzik*, M. Szuplewska, R. Matlakowska, S. Mielnicki, D. Wibberg, A. Schlüter, A. Pühler i D. Bartosik. 2015. Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals. *Front. Microbiol.* 6: 152.

IF₂₀₁₃ – **3,941**; IF_{5-letni} – **3,924**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **0**.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentem (A. Pyzik) podczas wykonywania przez niego badań, które weszły w skład publikacji; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza i zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji plazmidów pLM16A1, pLM19O1-2, pLM20P1-5 oraz pLM21S1; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- ii. **Dziewit L.**, J. Czarnecki, D. Wibberg, M. Radlinska, P. Mrozek, M. Szymczak*, A. Schlüter, A. Pühler i D. Bartosik. 2014. Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics* 15: 124.

IF₂₀₁₃ – **4,041**; IF_{5-letni} – **4,5**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **3**.

Wkład habilitanta: **50%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza i zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji genomu szczepu JCM 7686; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; pozyskanie finansowania badań (granty nr IP2010 008670 i IP2011 011471); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iii. **Dziewit L.** i D. Bartosik. 2014. Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Front. Microbiol.* 5: 596.

IF₂₀₁₃ – **3,941**; IF_{5-letni} – **3,924**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **1**.

Wkład habilitanta: **90%**. Autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie i wykonanie analiz; interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; pozyskanie finansowania badań (grant nr 2013/09/D/NZ8/03046); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- iv. **Dziewit L.**, A. Pyzik*, R. Matlakowska, J. Baj, M. Szuplewska i D. Bartosik. 2013. Characterization of *Halomonas* sp. ZM3 isolated from the Zelazny Most post-flotation waste reservoir, with a special focus on its mobile DNA. *BMC Microbiol.* 13: 59.

IF₂₀₁₃ – **2,976**; IF_{5-letni} – **3,452**; punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **3**.

Wkład habilitanta: **50%**. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentem (A. Pyzik) podczas wykonywania przez niego badań,

które weszły w skład publikacji; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza oraz zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji plazmidu pZM3H1 i elementów transpozycyjnych *ISHsp1* i *ISHsp2*; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie tabeli i wszystkich rycin; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- v. **Dziewiit L.**, A. Cegielski*, K. Romaniuk*, W. Uhrynowski*, A. Szych*, P. Niesiobedzki*, M.J. Zmuda-Baranowska, M.K. Zdanowski i D. Bartosik. 2013. Plasmid diversity in arctic strains of *Psychrobacter* spp. *Extremophiles* 17: 433-444.

IF₂₀₁₃ – **2,174**; IF_{5-letni} – **2,741**; punktacja MNiSW – **25**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **4**.

Wkład habilitanta: **55%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentami (A. Cegielski, K. Romaniuk, W. Uhrynowski, A. Szych i P. Niesiobedzki) podczas wykonywania przez nich badań, które weszły w skład publikacji; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza i zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji wszystkich plazmidów opisanych w pracy; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie tabeli i wszystkich rycin; pozyskanie finansowania badań (grant nr N N303 816340); przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- vi. **Dziewiit L.**, J. Grzesiak, A. Ciok*, M. Nieckarz*, M.K. Zdanowski i D. Bartosik. 2013. Sequence determination and analysis of three plasmids of *Pseudomonas* sp. GLE121, a psychrophile isolated from surface ice of Ecology Glacier (Antarctica). *Plasmid* 70: 254-262.

IF₂₀₁₃ – **1,76**; IF_{5-letni} – **1,918**; punktacja MNiSW – **20**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **2**.

Wkład habilitanta: **65%**. Autor korespondencyjny. Współautorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentką (A. Ciok) podczas wykonywania przez nią badań, które weszły w skład publikacji; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza i zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji wszystkich plazmidów opisanych w pracy; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu (przygotowanie jego pierwszej wersji); przygotowanie wszystkich rycin i tabel; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

- vii. **Dziewiit L.**, J. Baj, M. Szuplewska, A. Maj, M. Tabin*, A. Czyzkowska*, G. Skrzypczyk*, M. Adamczuk*, T. Sitarek*, P. Stawinski*, A. Tudek*, K. Wanasz*, E. Wardal*, E. Piechucka i D. Bartosik. 2012. Insights into the transposable mobilome of *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*). *PLoS ONE* 7: e32277.

IF₂₀₁₂ – **3,73**; IF_{5-letni} – **4,015**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg bazy Web of Science) – **5**.

Wkład habilitanta: **25%**. Zaplanowanie i wykonanie części doświadczeń; opieka nad studentami (M. Tabin i M. Adamczuk) podczas wykonywania przez nich badań, które weszły w skład publikacji; sekwencjonowanie DNA; adnotacja, analiza i zdeponowanie w bazie GenBank (NCBI) sekwencji elementów transpozycyjnych *IS1248f*, *ISPak1*, *ISPam1-ISPam4*, *ISPhae1*, *ISPlc1*, *ISPPa3a*, *ISPse1*, *ISPve1*, *Tn3434a* oraz *Tn6097*; analiza i interpretacja wyników badań; udział w przygotowaniu manuskryptu.

* studenci wykonujący prace dyplomowe w Zakładzie Genetyki Bakterii (Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski)

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z lat 2014/15 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF₂₀₁₃) – **22,563**.

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego – **225**.

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – **18**.

c) *Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.*

WSTĘP

Zmienność genomów prokariotycznych jest wypadkową dwóch procesów: (i) nabywania egzogenego DNA na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*) oraz (ii) rearanżacji informacji genetycznej, do których dochodzi w wyniku licznych zdarzeń rekombinacyjnych. Kluczową rolę w obu przypadkach pełnią ruchome elementy genetyczne (MGE, ang. *mobile genetic elements*), które uważane są za „siłę napędową” determinującą zmienność i tempo ewolucji bakterii (Siefert, 2009). Identyfikacja i analiza tego typu elementów, w odniesieniu do ogólnej charakterystyki ich gospodarzy, umożliwia nie tylko poznanie modułów genetycznych warunkujących adaptację mikroorganizmów do zmiennych warunków środowiska, lecz również wyciągnięcie bardziej ogólnych wniosków na temat roli mobilnego DNA w biologii i ekologii bakterii.

Ruchome elementy genetyczne są składnikami niemal wszystkich genomów prokariotycznych. Są one są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem budowy, jak i właściwości oraz sposobu przemieszczania się w obrębie genomu lub między genomami różnych bakterii. Do MGE zaliczono: (i) plazmidy, (ii) elementy integrujące z DNA (IE, ang. *integrative elements*), (iii) elementy transpozycyjne (TE, ang. *transposable elements*) oraz (iv) „samowycinające się pasożyty molekularne” (SSMP, ang. *self-splicing molecular parasites*) (Siefert, 2009). W ramach badań, które doprowadziły do powstania przedstawionego osiągnięcia naukowego, scharakteryzowano przedstawicieli dwóch najliczniejszych grup ruchomych elementów genetycznych, tj. plazmidów i elementów transpozycyjnych.

Plazmidy to pozachromosomowe cząsteczki DNA, które mają zdolność do autonomicznej replikacji. Występują one powszechnie w genomach licznych bakterii, archeonów oraz niektórych eukariotów. Plazmidy nie są niezbędne do przeżycia swoich gospodarzy, niemniej jednak, często niosą one informację genetyczną, która zapewnia mikroorganizmom przewagę w konkurencji z innymi populacjami zasiedlającymi daną niszę ekologiczną.

Plazmidy zaliczono do różnych grup niezgodności (Inc, ang. *incompatibility groups*), a w każdej z nich zebrano replikony, które, ze względu na występowanie pokrewnych systemów replikacyjnych, nie mogą stabilnie współwystępować w jednej komórce bakteryjnej. Plazmidy są również niekiedy klasyfikowane na podstawie: (i) ich liczby kopii, (ii) determinowanych przez nie funkcji biologicznych, (iii) zakresu gospodarzy, czy też (iv) zdolności do transferu koniugacyjnego (Siefert, 2009).

W genomach większości plazmidów można wyróżnić dwie podstawowe grupy modułów genetycznych. Pierwsza skupia moduły tzw. konserwowanego szkieletu plazmidu (ang. *plasmid backbone*), do których należą: (i) moduły replikacyjne, (ii) moduły stabilizujące plazmidy w komórkach gospodarza oraz (iii) moduły odpowiedzialne za transfer koniugacyjny. Do drugiej grupy zaliczane są moduły stanowiące dodatkowy, bardzo różnorodny ładunek genetyczny (ang. *additional genetic load*), w tym m.in. moduły fenotypowe, a także inne ruchome elementy genetyczne, które zostały wbudowane do genomów plazmidowych. Ta modułarna, mozaikowa struktura ulega licznym modyfikacjom w wyniku

różnych zdarzeń rekombinacyjnych (np. rekombinacji homologicznej i transpozycji), do których dochodzi w komórkach kolejnych gospodarzy (Thomas, 2000).

Analiza plazmidów dostarcza cennej informacji na temat zmienności i adaptacji bakterii do zmieniających się warunków środowiska. W ich genomach często identyfikuje się liczne determinanty genetyczne warunkujące m.in.: (i) oporność na antybiotyki i jony metali – plazmidy opornościowe [np. (Rahube et al., 2014)], (ii) zdolność do degradacji różnych związków, w tym toksycznych dla innych organizmów – plazmidy kataboliczne [np. (Trefault et al., 2004)], (iii) zdolność do produkcji czynników wirulencji – plazmidy wirulencji [np. (Uchiya et al., 2015)], (iv) zdolność do produkcji bakteriocyn i antybiotyków [np. (Kirby et al., 1975)] oraz (v) interakcje bakterii z roślinami [np. (Brom et al., 2002)]. Zakres plazmidowo kodowanych cech jest jednak znacznie większy i obejmuje również m.in. nadawanie zdolności do tworzenia biofilmu, wytwarzania pęcherzyków gazowych, pigmentacji i fermentacji laktozy (Smith and Parsell, 1976; Pfeifer et al., 1988; Hundle et al., 1994; Frank et al., 2015).

Drugą grupę MGE, charakteryzowaną w ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego, stanowią elementy transpozycyjne. Występują one powszechnie zarówno w genomach prokariotycznych, jak i eukariotycznych, a ich charakterystyczną cechą jest zdolność do przemieszczania się w genomie (w obrębie jednego, bądź między różnymi, współwystępującymi replikonami) na drodze transpozycji, tj. rekombinacji nieuprawnionej katalizowanej przez transpozazę (Mahillon and Chandler, 1998).

Najliczniejszą grupę TE stanowią sekwencje insercyjne (IS, ang. *insertion sequence*), które charakteryzują się zwartą budową. Wielkość IS zawiera się w przedziale od 700 pz do około 3500 pz. Elementy te niosą zwykle pojedynczą otwartą ramkę odczytu kodującą transpozazę, a na końcach zawierają odwrócone powtórzenia sekwencji IR (ang. *inverted repeat*), które stanowią miejsce oddziaływania z transpozazą. Sekwencje insercyjne, mimo prostej struktury genetycznej, są bardzo zróżnicowane, dzięki czemu możliwe było wyróżnienie aż 22 rodzin tych elementów (Mahillon and Chandler, 1998; Siefert, 2009).

Drugą ważną grupę TE stanowią transpozony (Tn), do których zaliczono: (i) transpozony złożone, (ii) transpozony niezłożone, a także (iii) moduły transpozycyjne (TMo, ang. *transposable module*) i elementy ISCR (ang. *IS91-like common region*).

Transpozony złożone składają się z regionu centralnego (ang. *core region*), który jest oflankowany dwiema sekwencjami insercyjnymi. Region ten może zawierać dowolny fragment genomu, który ulega mobilizacji do transpozycji przez IS. Rodzaj przenoszonej informacji genetycznej jest więc w pełni uwarunkowany pierwotną lokalizacją IS w genomie. Generowanie transpozonów złożonych znacząco wzbogaca pulę mobilnego DNA uczestniczącego w HGT, a jego wprowadzenie do komórek nowych gospodarzy często prowadzi do zmiany ich właściwości metabolicznych oraz pojawienia się fenotypów oporności na antybiotyki i jony metali ciężkich (Mollet et al., 1985; Stibitz and Davies, 1987; van der Meer et al., 1991; Merlin et al., 2000; Inui et al., 2005).

Zdolność mobilizacji do transpozycji pierwotnie „nieruchomych” fragmentów DNA zaobserwowano również w przypadku modułów transpozycyjnych (TMo), generowanych przez sekwencje insercyjne z rodziny IS1380. Mogą one mobilizować segmenty genomu o różnej wielkości, sąsiadujące z końcem 3' IS, dzięki tzw. transpozycji z jednego końca (ang. *one-ended transposition*) [np. (Bartosik et al., 2008)]. Podobny sposób mobilizacji przyległych regionów genomu zaobserwowano również u elementów typu ISCR, będących pochodnymi sekwencji insercyjnych, pokrewnych z rodziną IS91 (Toleman et al., 2006).

Kolejną grupę autonomicznych TE stanowią transpozony niezłożone. Ich mobilność nie jest determinowana obecnością IS, lecz jest w pełni zależna od transpozazy kodowanej w obrębie danego transpozonu. Większość tych elementów zawiera różnorodne moduły fenotypowe [np. (Nisen et al., 1977; Kholodii et al., 2000; Merlin et al., 2000)].

Odrębną grupę TE stanowią również tzw. miniaturowe, nieautonomiczne elementy transpozycyjne, zawierające odwrócone powtórzenia sekwencji (MITE, ang. *miniature inverted-repeat transposable element*). Elementy te nie kodują własnych transpozaz, a ich źródłem są pokrewne, autonomiczne transpozony współwystępujące w komórce bakterii (Delilhas, 2008; Szuplewska et al., 2014).

W przedstawionym osiągnięciu naukowym analizowano ruchome elementy genetyczne występujące w wybranych kolekcjach bakterii, zwracając szczególną uwagę na relacje: MGE-gospodarz. Jako model badawczy wybrano bakterie ekstremofilne, tolerujących, a niekiedy wręcz wymagających do

życia warunków, które są niekorzystne dla innych organizmów. W publikacjach stanowiących podstawę wskazanego osiągnięcia naukowego skupiono się na trzech grupach ekstremofili, tj. bakteriach: (i) psychrotolerancyjnych, (ii) metalotolerancyjnych oraz (iii) zdolnych do degradacji organicznych związków toksycznych, a jednocześnie tolerujących ich wysokie stężenia.

RUCHOME ELEMENTY GENETYCZNE BAKTERII PSYCHROTOLERANCYJNYCH

PUBLIKACJE HABILITANTA W TEMACIE:

Dziewit L. i D. Bartosik. 2014. Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Front. Microbiol.* 5: 596.

Dziewit L., A. Cegielski, K. Romaniuk, W. Uhrynowski, A. Szych, P. Niesiobedzki, M.J. Zmuda-Baranowska, M.K. Zdanowski i D. Bartosik. 2013. Plasmid diversity in arctic strains of *Psychrobacter* spp. *Extremophiles* 17: 433-444.

Dziewit L., J. Grzesiak, A. Ciok, M. Nieckarz, M.K. Zdanowski i D. Bartosik. 2013. Sequence determination and analysis of three plasmids of *Pseudomonas* sp. GLE121, a psychrophile isolated from surface ice of Ecology Glacier (Antarctica). *Plasmid* 70: 254-262.

Szacuje się, że w ponad 80% objętości biosfery naszej planety panuje nieprzerwanie temperatura nieprzekraczająca 5 °C. Mikroorganizmy, które przystosowały się do bytowania w warunkach permanentnego chłodu są nazywane psychrotolerancyjnymi. Psychrotoleranty zwykle nie są zdolne do wzrostu w temperaturach wyższych niż 30°C, co świadczy o ich ścisłym przystosowaniu do życia w chłodzie.

W ramach prowadzonych przeze mnie badań eksperymentalnych przeprowadzono analizy jednego szczepu „zimnolubnego” – *Pseudomonas* sp. GLE121, wyizolowanego z powierzchni Lodowca Ekologii w Antarktyce (Dziewit et al., 2013b) oraz sześciu szczepów bakterii psychrotolerancyjnych z rodzaju *Psychrobacter*, które zostały wyizolowane z pokładów ornitogennych na wyspie Spitsbergen w Arktyce (Dziewit et al., 2013a) (szczepy zdefiniowane na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA). Wykazano, że są to bakterie obligatoryjnie zimnolubne (nie rosną w temperaturze przekraczającej 25°C) i wykazują niski lub średni poziom oporności na niektóre jony metali ciężkich, tj. arsen (V), cynk, chrom (VI) oraz miedź. Analiza profili replikonów pozachromosomowych tych szczepów wykazała obecność 3 plazmidów w *Pseudomonas* sp. GLE121 (w zakresie wielkości od 6,9 kb do 39,6 kb) oraz 9 plazmidów w *Psychrobacter* spp. (w zakresie wielkości od 2,9 kb do 14,9 kb). Wszystkie zidentyfikowane plazmidy zostały zsekwencjonowane.

Analiza odczytanych sekwencji nukleotydowych wykazała, że dwa najmniejsze replikony szczepu GLE121 są kryptyczne (nie niosą modułów fenotypowych) i należą do różnych grup niezgodności, odpowiednio, IncP-9 i IncP-7. Największy replikon zawierał system transferu koniugacyjnego i wykazywał znaczne podobieństwo sekwencji do plazmidu pNCPB880-40 z *Pseudomonas syringae* pathovar tomato NCPB880 (numer dostępu: NC_019341). Jednak, w odróżnieniu od pNCPB880-40, nowozidentyfikowany plazmid niósł moduł fenotypowy – operon *ruIAB*, kodujący białka systemu naprawy uszkodzeń DNA, które mogą być wywołane pod wpływem promieniowaniem UV. Obecność takiego modułu może mieć duże znaczenie adaptacyjne w środowisku antarktycznym, gdzie promieniowania UV jest szczególnie nasilone.

Analiza sekwencji plazmidów *Psychrobacter* spp. wykazała, że:

- zidentyfikowane plazmidy zawierają dwa typy systemów replikacyjnych, tj. *repA* (plazmidy typu ColE2) i *repB* (plazmidy typu „iteronowego”),
- 8 spośród zidentyfikowanych replikonów niesie moduły odpowiedzialne za mobilizację do transferu koniugacyjnego (MOB), reprezentujące trzy rodziny systemów – MOB_P, MOB_Q i MOB_V,
- plazmid pP60P2 niesie 2 moduły genetyczne o znaczeniu adaptacyjnym, tj. (i) system restrykcji i modyfikacji typu II, który może zarówno pełnić funkcje systemu stabilizującego, jak i stanowić ochronę bakterii przed infekcją bakteriofagowym DNA [np. (Dziewit et al., 2011)] oraz (ii) gen *ahpC*, kodujący enzym o działaniu antyoksydacyjnym - reduktazę wodoronadtlenków alkilowych, odpowiedzialną za redukcję i detoksykację H₂O₂ oraz organicznych nadtlenków (Steele et al., 2010).

Rola kodowanego plazmidowo białka AhpC w arktycznym szczepie *Psychrobacter* sp. może być ściśle związana z warunkami panującymi w tym środowisku. Globalne ocieplenie klimatu oraz sezonowo

obserwowane zmniejszanie warstwy ozonowej w regionach polarnych (ang. *springtime polar ozone depletion*) powodują wzrost promieniowania UV, co w koniunkcji z innymi czynnikami stresowymi, na które narażone są komórki bakteryjne (np. obecność związków toksycznych, związana z narastającym zanieczyszczeniem środowiska), znacznie zwiększa ilość produkowanych przez bakterie szkodliwych wolnych rodników (Regoli et al., 2000; Müller et al., 2012). W tej sytuacji, wprowadzenie do komórki plazmidu zapewniającego ekspresję dodatkowej kopii reduktazy wodoronadtlenków alkilowych o działaniu antyoksydacyjnym, może być bardzo korzystne.

W ramach przeprowadzonych badań wykonano również wstępną analizę bioinformatyczną mającą na celu zgromadzenie danych o poznanych dotąd plazmidach bakterii psychrofilnych oraz dokonanie ich klasyfikacji na podstawie różnicowania niesionych przez nie systemów replikacyjnych (Dziewit et al., 2013a). Badania te rozwinęto i poszerzono o meta-analizę wszystkich plazmidów bakterii psychrotolerancyjnych, których sekwencje zostały zdeponowane w dostępnych bazach danych (Dziewit and Bartosik, 2014).

W wyniku przeszukania baz danych zidentyfikowano łącznie 66 plazmidów bakterii psychrofilnych i psychrotolerancyjnych, których sekwencje poddano szczegółowym analizom bioinformatycznym. Analizy te obejmowały m.in. powtórny adnotację sekwencji nukleotydowych (było to konieczne ze względu na błędy i nieścisłości w adnotacji sekwencji zdeponowanych przez innych badaczy) oraz wyróżnienie modułów genetycznych determinujących funkcje i właściwości poszczególnych replikonów.

Stwierdzono, że niemal połowa analizowanych plazmidów to niewielkie replikony kryptyczne, o wielkości nieprzekraczającej 10 kb. Natomiast w pozostałych plazmidach zidentyfikowano liczne moduły o znaczeniu adaptacyjnym, w tym geny kodujące enzymy zapewniające: (i) ochronę przed zimnem, (ii) ochronę przed promieniowaniem UV, (iii) metabolizm aminokwasów, cukrów, lipidów i nukleotydów, (iv) produkcję i konwersję energii, (v) rozkład związków toksycznych, (vi) oporność na jony metali i antybiotyki, (vii) ruchliwość bakterii oraz (viii) ochronę przed egzogennym DNA. Wykazano również, że 50% analizowanych plazmidów niesie moduły genetyczne odpowiedzialne za transfer koniugacyjny. Poczynione obserwacje wskazują, że plazmidy bakterii psychrofilnych stanowią rezerwuar cech, które mogą okazać się przydatne w trudnych i zmiennych warunkach środowiskowych, dając przewagę gospodarzom nad innymi populacjami bakterii „zimnolubnych”, zasiedlającymi daną niszę ekologiczną (Dziewit and Bartosik, 2014).

GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA:

- Identyfikacja i kompleksowa analiza genomyczna 12 nieopisanych wcześniej plazmidów bakterii psychrotolerancyjnych.
- Identyfikacja modułów o znaczeniu adaptacyjnym, tj. (i) operonu *ruIAB* kodującego system naprawy uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV, (ii) systemu restrykcji i modyfikacji typu II zapewniającego ochronę przed obcym DNA oraz (iii) genu *ahpC* kodującego reduktazę wodoronadtlenków alkilowych, która ma działanie antyoksydacyjne.
- Przeprowadzenie pierwszej meta-analizy plazmidów psychrotolerantów, co pozwoliło ocenić udział tych MGE w adaptacji bakterii zimnolubnych.
- Identyfikacja, charakterystyka i skatalogowanie modułów fenotypowych plazmidów bakterii psychrotolerancyjnych.

RUCHOME ELEMENTY GENETYCZNE BAKTERII METALOTOLERANCYJNYCH

PUBLIKACJE HABILITANTA W TEMACIE:

Dziewit L., A. Pyzik, M. Szuplewska, R. Matlakowska, S. Mielnicki, D. Wibberg, A. Schlüter, A. Pühler i D. Bartosik. 2015. Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals. *Front. Microbiol.* 6: 152.

Dziewit L., A. Pyzik, R. Matlakowska, J. Baj, M. Szuplewska i D. Bartosik. 2013. Characterization of *Halomonas* sp. ZM3 isolated from the Zelazny Most post-flotation waste reservoir, with a special focus on its mobile DNA. *BMC Microbiol.* 13: 59.

Zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi jest zjawiskiem bardzo powszechnym. Wynika ono zarówno z naturalnie przebiegających procesów geochemicznych (tj. wietrzenia skał bogatych w metale, erupcji wulkanów, pożarów *etc.*), jak i działalności człowieka, związanej m.in. ze spalaniem paliw kopalnych oraz rozwojem górnictwa i hydrometalurgii (Adriano, 2001). Mikroorganizmy zamieszkujące tereny zanieczyszczone, nazywane metalotolerantami, wykształciły liczne mechanizmy umożliwiające im przeżycie w środowisku zawierającym dużą koncentrację metali ciężkich.

W ramach badań, które prowadziłem, dokonano analizy puli szczepów bakterii, wyizolowanych (i) z największego w Europie zbiornika odpadów poflotacyjnych - „Żelazny Most” (powierzchnia 1394 ha, objętość 340 mln m³) (Dziewit et al., 2013c) oraz sąsiadującej z nim (ii) kopalni miedzi „Lubin” (okręg kopalniany Lubin-Głogów) (Dziewit et al., 2015). Wszystkie zgromadzone szczepy, zidentyfikowane na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA, scharakteryzowano, zwracając szczególną uwagę na fenotypy oporności na jony metali ciężkich, które występują w obu środowiskach w bardzo wysokich stężeniach. Wykazano, że szczepy te są hipertolerancyjne i wielooporne w stosunku do badanych metali. Konsekwencją tych obserwacji było podjęcie analiz ruchomych elementów genetycznych tych szczepów, celem zbadania ich roli w generowaniu fenotypów o charakterze adaptacyjnym.

W szczepie *Halomonas* sp. ZM3 (metalotolerant i halofil wyizolowany ze zbiornika „Żelazny Most”, zdolny do wzrostu w warunkach wysokiego zasolenia - nawet do 12%) zidentyfikowano jeden plazmid oraz dwie funkcjonalne sekwencje insercyjne z rodziny IS5 oraz IS630 (Dziewit et al., 2013c). Należy podkreślić, że były to pierwsze zidentyfikowane i scharakteryzowane MGE bakterii z rodzaju *Halomonas*. Analiza genomowa plazmidu wykazała, że jest to replikon z grupy niezgodności IncU. Co ciekawe, zaobserwowano, że białko inicjujące replikację (Rep) tego plazmidu jest relatywnie odległe filogenetycznie od białek Rep innych plazmidów bakterii gramujemnych. W genomie tego replikonu zidentyfikowano fragment transpozonu z rodziny Tn3, zawierający dwa moduły genetyczne, warunkujące oporność na jony kobaltu, cynku, kadmu oraz rtęci. Oba moduły zostały sklonowane w wektorze o szerokim zakresie gospodarzy, co umożliwiło zbadanie ich funkcji w różnych bakteriach. W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano, że aktywność ww. modułów oporności jest zależna od „tła genetycznego” szczepów poszczególnych gospodarzy (Dziewit et al., 2013c).

Analogiczne analizy wykonano dla 20 szczepów wyizolowanych z kopalni „Lubin”. Zidentyfikowano w nich 11 nieopisanych wcześniej plazmidów (w zakresie wielkości od 1,7 kb do 117,5 kb), które pogrupowano w zależności od rodzaju niesionych przez nie modułów genetycznych. Były to: (i) trzy plazmidy warunkujące oporność na jony metali ciężkich, (ii) plazmid kataboliczny, (iii) plazmid-profag, (iv) dwa plazmidy wirulencji oraz (v) cztery plazmidy kryptyczne (Dziewit et al., 2015).

Spośród plazmidów opornościowych, na szczególną uwagę zasługuje replikon wyizolowany z *Achromobacter* sp. LM16. Plazmid ten zawiera funkcjonalny transpozon niezłożony, TnAO22a, warunkujący oporność na jony rtęci. Analiza systemu replikacyjnego tego plazmidu wykazała jego szeroki zakres gospodarzy, co podkreśla potencjał tego replikonu, jako naturalnego wektora, zdolnego do przekazywania modułu oporności nawet do odległych filogenetycznie gatunków bakterii (Dziewit et al., 2015).

Wszystkie zidentyfikowane w pracy moduły oporności zostały sklonowane w odpowiednim wektorze, co umożliwiło zbadanie ich aktywności w innych szczepach bakterii z kopalni „Lubin”. Również w tym przypadku zaobserwowano, że wprowadzenie modułów do poszczególnych szczepów, skutkowało różnymi fenotypami (tj. opornością na odmienne stężenia jonów, brakiem oporności, czy też, paradoksalnie, zwiększeniem wrażliwości biorcy na jony metali), co potwierdza wcześniejszą obserwację, wskazującą na rolę swoistych cech różnych gospodarzy w zapewnianiu fenotypów oporności (Dziewit et al., 2013c).

Wyniki te podkreślają, jak ważną rolę odgrywają relacje MGE-gospodarz. W świetle poczynionych obserwacji staje się oczywiste, że stwierdzenie obecności danego modułu oporności w genomach różnych szczepów bakterii, nie pozwala jednoznacznie wnioskować o warunkowanym fenotypie. Niezmiernie ważną rolę odgrywają zatem analizy funkcjonalne, jakim powinny być standardowo poddawane wyróżnione *in silico* moduły genetyczne.

Wśród pozostałych replikonów, zidentyfikowanych w bakteriach pochodzących z kopalni miedzi „Lubin”, znalazł się również plazmid kataboliczny, który niósł moduły fenotypowe odpowiedzialne za katabolizm histydyny i kwasu wanilinowego. Związki te, dzięki obecności odpowiednich enzymów (kodowanych w zidentyfikowanych modułach), mogą zostać wykorzystane przez bakterie jako alternatywne źródło węgla. Ponadto, w *Sinorhizobium* sp. LM21 zidentyfikowano interesujący replikon, łączący cechy zarówno plazmidów (system replikacyjny typu *repC* charakterystyczny dla plazmidów *Alphaproteobacteria*), jak i bakteriofagów (pełen zestaw genów spotykanych w genomach fagów). Analizy porównawcze pozwoliły stwierdzić, że zidentyfikowany plazmid-profag wykazuje podobieństwo

sekwencji do indukowalnego faga RHEph10 zidentyfikowanego w *Rhizobium etli* (Santamaria et al., 2014). Oba elementy są więc archetypami nowej rodziny dość nietypowych fagów, zawierających elementy plazmidów *Alphaproteobacteria*. Co ciekawe, w plazmidzie-profagu ze szczepu LM21 zidentyfikowano moduł fenotypowy, odpowiedzialny za syntezę *de novo* NAD⁺. Jest zatem prawdopodobne, że wprowadzenie w tym replikonie dodatkowych genów zaangażowanych w produkcję NAD może zwiększyć zdolności przystosowawcze gospodarza do warunków wymagającego środowiska [NAD⁺ i jego pochodne są najważniejszymi koenzymami w komórkowych reakcjach utleniania i redukcji (Martin et al., 2001)].

GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA:

- Identyfikacja i kompleksowa analiza genomiczna 12 nieopisanych wcześniej plazmidów oraz 2 sekwencji insercyjnych bakterii metalotolerancyjnych, przy czym dla niektórych rodzajów bakterii (np. *Halomonas*) były to pierwsze opisane MGE.
- Identyfikacja i charakterystyka plazmidu-profaga stanowiącego archetyp nowej rodziny fagów bakterii z klasy *Alphaproteobacteria*.
- Wykazanie, że aktywność modułów oporności na jony metali ciężkich jest zależna od „tła genetycznego” w danym gospodarzu.
- Wykazanie możliwości przenoszenia na plazmidach modułów związanych z katabolizmem histydyny i kwasu wanilinowego oraz syntezą *de novo* NAD⁺.

RUCHOME ELEMENTY GENETYCZNE BAKTERII ROZKŁADAJĄCYCH ZWIĄZKI TOKSYCZNE

PUBLIKACJE HABILITANTA W TEMACIE:

Dziewit L., J. Czarnecki, D. Wibberg, M. Radlinska, P. Mrozek, M. Szymczak, A. Schlüter, A. Pühler i D. Bartosik. 2014. Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics* 15: 124.

Dziewit L., J. Baj, M. Szuplewska, A. Maj, M. Tabin, A. Czyzkowska, G. Skrzypczyk, M. Adamczuk, T. Sitarek, P. Stawinski, A. Tudek, K. Wanasz, E. Wardal, E. Piechucka i D. Bartosik. 2012. Insights into the transposable mobilome of *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*). *PLoS ONE* 7: e32277.

Interesującą grupę wśród ekstremofili stanowią bakterie zdolne do degradacji związków toksycznych, często pochodzenia antropogenicznego. Mikroorganizmy te są zazwyczaj hipertolerancyjne wobec utylizowanych związków. Właściwości takie mają niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*), które wykorzystują, jako źródło węgla i energii, liczne związki, które są toksyczne dla innych organizmów, m.in. pestycydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, aceton i tiocyjanian. Dzięki temu mikroorganizmy te znajdują zastosowania np. w systemach bioremediacyjnych (Foglar et al., 2005; Swaroop et al., 2009; Sanjeevkumar et al., 2013).

Bakterie z rodzaju *Paracoccus*, badane przeze mnie w ramach przedstawionego osiągnięcia naukowego, pochodziły z: (i) zanieczyszczonej gleby (*P. aminophilus*, *P. alcaliphilus* i *P. versutus*), (ii) biofiltra toksycznych gazów (*P. alkenifer*), (iii) bioreaktora, w którym prowadzono proces denitryfikacji (*P. ferrooxidans*) oraz (iv) oczyszczalni ścieków (*P. pantotrophus*). Wykazano, że szczepy te mogą utylizować różne toksyczne związki organiczne, w tym typu C1 (nie posiadające wiązań węgiel-węgiel), np. *N,N*-dimetyloformamid (DMF), metyloaminy, metanol (Urakami et al., 1989; Urakami et al., 1990; Katayama et al., 1995; Lipski et al., 1998; Kelly et al., 2006; Kumaraswamy et al., 2006).

Wykorzystując zestaw wektorów pułapkowych, służących do identyfikacji funkcjonalnych elementów transpozycyjnych, przeprowadzono kompleksową analizę szczepów z 20 gatunków *Paracoccus*. Dzięki temu zidentyfikowano 37 sekwencji insercyjnych, reprezentujących 9 rodzin IS (IS3, IS5, IS6, IS21, IS66, IS256, IS1182, IS1380 i IS1634), (ii) 3 transpozony niezłożone z rodziny Tn3, w tym Tn5393 warunkujący oporność na streptomycynę, (iii) mobilną wyspę genomową TnPpa1 oraz (iv) transpozon złożony Tn6097, niosący moduły fenotypowe warunkujące rozkład argininy w warunkach beztlenowych oraz oporność na daunorubicynę i doksorubicynę (tj. antybiotyki z grupy antracyklin o działaniu cytostatycznym, stosowane głównie w terapiach przeciwnowotworowych) (Dziewit et al., 2012).

Przeprowadzono również analizy funkcjonalne wybranych TE, dzięki czemu wykazano, że sekwencja ISPve1 (rodzina IS21) może generować podczas transpozycji rozległe, jednokierunkowe delekcje segmentów DNA, przyległych do miejsca insercji elementu. Jest to unikatowa cecha wśród poznanych dotąd IS, która może prowadzić do znaczących zmian w strukturze genomu gospodarza (Dziewit et al., 2012).

Zbadano również, w jaki sposób elementy transpozycyjne oraz sam proces transpozycji mogą zapewnić ekspresję bezpromotorowych genów, znajdujących się poniżej miejsca docelowego transpozycji. Wykazano, że geny takie mogą być aktywowane dzięki: (i) obecności promotora znajdującego się w terminalnej części TE, (ii) wytworzeniu hybrydowego promotora, w którym heksamer -35 jest dostarczony przez TE, a sekwencja -10 występuje w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca docelowego transpozycji, (iii) aktywności promotora transpozazy, (iv) aktywności promotora usytuowanego w regionie rdzeniowym transpozozonów złożonych, lub (v) dostarczeniu promotora pochodzącego z innego replikonu poprzez utworzenie kointegratu, powstałego w wyniku transpozycji replikacyjnej (Dziewit et al., 2012).

Badając bakterie z rodzaju *Paracoccus* szczególną uwagę zwrócono na szczep *P. aminophilus* JCM 7686. Jest to bakteria metylotroficzna, zdolna do wykorzystywania związków typu C1 jako źródła węgla, azotu i energii. Szczep ten nie tylko wydajnie utylizuje toksyczny DMF, formamid, metyloaminy i metanol, lecz również toleruje ich bardzo wysokie stężenia w podłożu (Urakami et al., 1990; Dziewit et al., 2010; Dziewit et al., 2014).

Odczytano kompletną sekwencję nukleotydową genomu *P. aminophilus* JCM 7686, dokonano jej adnotacji oraz dogłębnej analizy. Wykazano, że genom tego szczepu ma złożoną strukturę, bowiem w jego skład, oprócz pojedynczego, kolistego chromosomu, wchodzi aż osiem replikonów pozachromosomowych, w zakresie wielkości od 5,6 kb do 438,1 kb. Analizy funkcjonalne wykazały, że dwa z nich to elementy niezbędne do przeżycia gospodarza, czyli tzw. chromidy, które łączą cechy plazmidów (struktura, system replikacyjny) i chromosomów (geny metabolizmu podstawowego). Dokonano też klasyfikacji chromidów, wyróżniając chromidy (i) pierwszorzędowe – obligatoryjnie potrzebne do przeżycia gospodarza (np. pAMI5 z JCM 7686 niosący geny *nadABC* odpowiedzialne za biosyntezę NAD) oraz (ii) drugorzędowe - niezbędne bakteriom tylko w określonych warunkach środowiska (np. pAMI6, zawierający jedyną kopię genu transportera amoniaku w genomie JCM 7686). Pozostałe replikony pozachromosomowe analizowanego szczepu to plazmidy, w których również zidentyfikowano geny o znaczeniu adaptacyjnym, np. w pAMI2 odkryto moduł kodujący *N,N*-dimetyloformamidazę (DMFazę) odpowiedzialną za rozkład DMF (Dziewit et al., 2010; Dziewit et al., 2014).

Ponadto, w genomie *P. aminophilus* zidentyfikowano *in silico* wiele innych MGE, w tym: (i) 20 sekwencji insercyjnych, (ii) 4 transpozony niezłożone z rodziny Tn3 oraz (iii) 10 regionów profagowych, z których jeden, ϕ Pam-6, stanowił genom funkcjonalnego bakteriofaga, kodującego, nietypową dla fagów dsDNA, integrasę serynową. Przeprowadzono, również kompleksową analizę genomu szczepu JCM 7686 w celu identyfikacji składowych sieci regulacji transkrypcji, odpowiedzi na stres, rekombinacji oraz naprawy i metylacji DNA (Dziewit et al., 2014).

GLÓWNE OSIĄGNIĘCIA:

- Kompleksowa charakterystyka elementów transpozycyjnych wchodzących w skład mobilomu *Paracoccus* spp.
- Identyfikacja nieopisanych wcześniej elementów transpozycyjnych, w tym transpozozonu złożonego Tn6097, niosącego moduły fenotypowe warunkujące rozkład argininy w warunkach beztlenowych oraz oporność na daunorubicynę i doksorubicynę.
- Wykazanie, że sekwencja *ISPve1* (rodzina IS21) może generować duże jednokierunkowe delecje regionów DNA przyległych do końca 5' IS.
- Opisanie sposobów aktywacji transkrypcji przyległych genów przez elementy transpozycyjne.
- Odczytanie pełnej sekwencji genomu *P. aminophilus* i kompleksowa analiza jego struktury oraz funkcji.
- Identyfikacja i analiza funkcjonalna chromidów pierwszo- i drugorzędowych *P. aminophilus*.
- Identyfikacja i analiza genomu pierwszego funkcjonalnego faga *Paracoccus* spp.

PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszym wniosku prace, w których opisano analizę struktury i funkcji licznych ruchomych elementów genetycznych, obejmują badania z zakresu zarówno mikrobiologii środowiskowej, jak i genetyki, ekologii molekularnej, biologii molekularnej, bioinformatyki oraz genomiki, w tym genomiki porównawczej. Są to zatem badania interdyscyplinarne o wymiarze ogólnobiologicznym, których myślą przewodnią jest poznanie genetycznych podstaw zmienności mikroorganizmów oraz ich adaptacji do środowisk, określanych jako ekstremalne. Należy podkreślić, że nie są to środowiska niszowe, bowiem,

jak widać na przykładzie środowisk zimnych, mogą one obejmować znaczącą część biosfery naszej planety. W przeprowadzonych badaniach dużo uwagi poświęcono relacjom MGE-gospodarz, wskazując m.in. na możliwość „niedopasowania” modułu genetycznego plazmidu do niektórych szczepów bakterii, co może skutkować pojawieniem się zaskakujących fenotypów (np. „uwrażliwienie” szczepu na jony metali ciężkich, po wprowadzeniu danego modułu opornościowego). Należy również podkreślić, że uzyskanie przez komórki bakterii modułów adaptacyjnych, może prowadzić do powstania szczepów „pionierskich”, zdolnych nie tylko do zasiedlenia nowego środowiska, lecz również do zmiany jego właściwości (np. poprzez eliminację związków toksycznych i jonów metali ciężkich), co czyni je dostępnym dla innych organizmów.

PLANY NAUKOWE

W najbliższych latach planuję realizację projektów naukowych związanych z następującymi zagadnieniami:

- genomika bakterii psychrotolerancyjnych pochodzących z Arktyki i Antarktyki – badania te są kontynuacją już rozpoczętych prac i dotyczą identyfikacji ruchomych elementów genetycznych bakterii psychrotolerancyjnych oraz analizy funkcjonalnej modułów adaptacyjnych niesionych przez te MGE;
- metagenomiczna charakterystyka środowisk polarnych – badania będą stanowiły uzupełnienie i rozwinięcie analiz genomicznych i umożliwią wgląd w strukturę zespołów mikroorganizmów zasiedlających regiony polarne;
- identyfikacja i charakterystyka bakteriofagów *Alphaproteobacteria* – badania mają na celu poznanie i scharakteryzowanie puli fagów lizogennych i litycznych, a także sekwencji profagowych *Alphaproteobacteria* oraz stworzenie modeli sieci powiązań ewolucyjnych pomiędzy bakteriofagami występującymi w jednej grupie taksonomicznej bakterii;
- opracowanie technologii produkcji biogazu z osadów ściekowych – badania dotyczą opracowania technologii przyspieszonej utylizacji osadów ściekowych pochodzących z oczyszczalni ścieków z wykorzystaniem biopreparatów oraz biosuplementów zwiększających tempo i wydajność procesu fermentacji metanowej.

LITERATURA

Adriano, D.C. (2001). *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. New York: Springer.

Bartosik, D., Putyrski, M., Dziewit, L., Malewska, E., Szymanik, M., Jagiello, E., Lukasz, J., and Baj, J. (2008). Transposable modules generated by a single copy of insertion sequence *IS_{Pme1}* and their influence on structure and evolution of natural plasmids of *Paracoccus methylutens* DM12. *J. Bacteriol.* 190, 3306-3313.

Brom, S., Girard, L., Garcia-De Los Santos, A., Sanjuan-Pinilla, J.M., Olivares, J., and Sanjuan, J. (2002). Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2555-2561.

Delilhas, N. (2008). Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Mol. Microbiol.* 67, 475-481.

Dziewit, L., Baj, J., Szuplewska, M., Maj, A., Tabin, M., Czyzkowska, A., Skrzypczyk, G., Adamczuk, M., Sitarek, T., Stawinski, P., Tudek, A., Wanasz, K., Wardal, E., Piechucka, E., and Bartosik, D. (2012). Insights into the transposable mobilome of *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*). *PLoS One* 7, e32277.

Dziewit, L., and Bartosik, D. (2014). Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Front. Microbiol.* 5, 596.

Dziewit, L., Cegielski, A., Romaniuk, K., Uhrynowski, W., Szych, A., Niesiobedzki, P., Zmuda-Baranowska, M.J., Zdanowski, M.K., and Bartosik, D. (2013a). Plasmid diversity in arctic strains of *Psychrobacter* spp. *Extremophiles* 17, 433-444.

- Dziewit, L., Czarnecki, J., Wibberg, D., Radlinska, M., Mrozek, P., Szymczak, M., Schlüter, A., Pühler, A., and Bartosik, D. (2014). Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics* 15, 124.
- Dziewit, L., Dmowski, M., Baj, J., and Bartosik, D. (2010). Plasmid pAMI2 of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 carries *N,N*-dimethylformamide degradation-related genes whose expression is activated by a LuxR family regulator. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1861-1869.
- Dziewit, L., Grzesiak, J., Ciok, A., Nieckarz, M., Zdanowski, M.K., and Bartosik, D. (2013b). Sequence determination and analysis of three plasmids of *Pseudomonas* sp. GLE121, a psychrophile isolated from surface ice of Ecology Glacier (Antarctica). *Plasmid* 70, 254-262.
- Dziewit, L., Kuczkowska, K., Adamczuk, M., Radlinska, M., and Bartosik, D. (2011). Functional characterization of the type II Paml restriction-modification system derived from plasmid pAMI7 of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *FEMS Microbiol. Lett.* 324, 56-63.
- Dziewit, L., Pyzik, A., Matlakowska, R., Baj, J., Szuplewska, M., and Bartosik, D. (2013c). Characterization of *Halomonas* sp. ZM3 isolated from the Zelazny Most post-flotation waste reservoir, with a special focus on its mobile DNA. *BMC Microbiol.* 13, 59.
- Dziewit, L., Pyzik, A., Szuplewska, M., Matlakowska, R., Mielnicki, S., Wibberg, D., Schlüter, A., Pühler, A., and Bartosik, D. (2015). Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals. *Front. Microbiol.* 6, 152.
- Foglar, L., Briski, F., Sipos, L., and Vukovic, M. (2005). High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture. *Bioresour. Technol.* 96, 879-888.
- Frank, O., Michael, V., Pauker, O., Boedeker, C., Jogler, C., Rohde, M., and Petersen, J. (2015). Plasmid curing and the loss of grip - the 65-kb replicon of *Phaeobacter inhibens* DSM 17395 is required for biofilm formation, motility and the colonization of marine algae. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 120-127.
- Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D.H., and Hearst, J.E. (1994). Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 245, 406-416.
- Inui, M., Tsuge, Y., Suzuki, N., Vertes, A.A., and Yukawa, H. (2005). Isolation and characterization of a native composite transposon, Tn14751, carrying 17.4 kilobases of *Corynebacterium glutamicum* chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 407-416.
- Katayama, Y., Hiraishi, A., and Kuraishi, H. (1995). *Paracoccus thiocyanatus* sp. nov., a new species of thiocyanate-utilizing facultative chemolithotroph, and transfer of *Thiobacillus versutus* to the genus *Paracoccus* as *Paracoccus versutus* comb. nov. with emendation of the genus. *Microbiology* 141, 1469-1477.
- Kelly, D.P., Euzeby, J.P., Goodhew, C.F., and Wood, A.P. (2006). Redefining *Paracoccus denitrificans* and *Paracoccus pantotrophus* and the case for a reassessment of the strains held by international culture collections. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2495-2500.
- Kholodii, G., Yurieva, O., Mindlin, S., Gorlenko, Z., Rybochkin, V., and Nikiforov, V. (2000). Tn5044, a novel Tn3 family transposon coding for temperature-sensitive mercury resistance. *Res. Microbiol.* 151, 291-302.
- Kirby, R., Wright, L.F., and Hopwood, D.A. (1975). Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* 254, 265-267.
- Kumaraswamy, R., Sjollem, K., Kuenen, G., Van Loosdrecht, M., and Muyzer, G. (2006). Nitrate-dependent [Fe(II)EDTA]₂-oxidation by *Paracoccus ferrooxidans* sp. nov., isolated from a denitrifying bioreactor. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 276-286.
- Lipski, A., Reichert, K., Reuter, B., Sproer, C., and Altendorf, K. (1998). Identification of bacterial isolates from biofilters as *Paracoccus alkenifer* sp. nov. and *Paracoccus solventivorans* with emended description of *Paracoccus solventivorans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 529-536.
- Mahillon, J., and Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725-774.
- Martin, P.R., Shea, R.J., and Mulks, M.H. (2001). Identification of a plasmid-encoded gene from *Haemophilus ducreyi* which confers NAD independence. *J. Bacteriol.* 183, 1168-1174.
- Merlin, C., Mahillon, J., Nesvera, J., and Toussaint, A. (2000). "Gene recruiters and transporters: the modular structure of bacterial mobile elements," in *The horizontal gene pool*, ed. C.M. Thomas. (Amsterdam: Harwood Academic Publishers), 363-409.
- Mollet, B., Clerget, M., Meyer, J., and Iida, S. (1985). Organization of the Tn6-related kanamycin resistance transposon Tn2680 carrying two copies of IS26 and an IS903 variant, IS903. *B. J. Bacteriol.* 163, 55-60.

- Müller, R., Desel, C., Steinhoff, F.S., Wiencke, C., and Bischof, K. (2012). UV radiation and elevated temperatures induce formation of reactive oxygen species in gametophytes of cold-temperate/Arctic kelps (*Laminariales*, *Phaeophyceae*). *Phycol. Res.* 60, 27-36.
- Nisen, P.D., Kopecko, D.J., Chou, J., and Cohen, S.N. (1977). Site-specific DNA deletions occurring adjacent to the termini of a transposable ampicillin resistance element (Tn3). *J. Mol. Biol.* 117, 975-978.
- Pfeifer, F., Blaseio, U., and Ghahraman, P. (1988). Dynamic plasmid populations in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 170, 3718-3724.
- Rahube, T.O., Viana, L.S., Koraimann, G., and Yost, C.K. (2014). Characterization and comparative analysis of antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *Front. Microbiol.* 5, 558.
- Regoli, F., Nigro, M., Bompadre, S., and Winston, G.W. (2000). Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops: differentiation between three potent oxidants. *Aquat. Toxicol.* 49, 13-25.
- Sanjeevkumar, S., Nayak, A.S., Santoshkumar, M., Siddavattam, D., and Karegoudar, T.B. (2013). *Paracoccus denitrificans* SD1 mediated augmentation with indigenous mixed cultures for enhanced removal of *N,N*-dimethylformamide from industrial effluents. *Biochem. Eng. J.* 79, 1-6.
- Santamaria, R.I., Bustos, P., Sepulveda-Robles, O., Lozano, L., Rodriguez, C., Fernandez, J.L., Juarez, S., Kameyama, L., Guarneros, G., Davila, G., and Gonzalez, V. (2014). Narrow-host-range bacteriophages that infect *Rhizobium etli* associate with distinct genomic types. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 446-454.
- Siefert, J.L. (2009). Defining the mobilome. *Methods Mol. Biol.* 532, 13-27.
- Smith, H.W., and Parsell, Z. (1976). A transmissible plasmid determining lactose fermentation and multiple antibiotic resistance in a strain of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 9, 359-362.
- Steele, K.H., Baumgartner, J.E., Valderas, M.W., and Roop, R.M., 2nd (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *J. Bacteriol.* 192, 4912-4922.
- Stibitz, S., and Davies, J.E. (1987). Tn602: a naturally occurring relative of Tn903 with direct repeats. *Plasmid* 17, 202-209.
- Swaroop, S., Sughosh, P., and Ramanathan, G. (2009). Biomineralization of *N,N*-dimethylformamide by *Paracoccus* sp. strain DMF. *J. Hazard. Mater.* 171, 268-272.
- Szuplewska, M., Ludwiczak, M., Lyzwa, K., Czarnecki, J., and Bartosik, D. (2014). Mobility and generation of mosaic non-autonomous transposons by Tn3-derived inverted-repeat miniature elements (TIMES). *PLoS One* 9, e105010.
- Thomas, C.M. (2000). Paradigms of plasmid organization. *Mol. Microbiol.* 37, 485-491.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296-316.
- Trefault, N., De La Iglesia, R., Molina, A.M., Manzano, M., Ledger, T., Perez-Pantoja, D., Sanchez, M.A., Stuardo, M., and Gonzalez, B. (2004). Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* 6, 655-668.
- Uchiya, K., Takahashi, H., Nakagawa, T., Yagi, T., Moriyama, M., Inagaki, T., Ichikawa, K., Nikai, T., and Ogawa, K. (2015). Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *PLoS One* 10, e0117797.
- Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K., and Komagata, K. (1990). *Paracoccus aminophilus* sp. nov. and *Paracoccus aminovorans* sp. nov., which utilize *N,N*-dimethylformamide. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 287-291.
- Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K., and Komagata, K. (1989). *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 116-121.
- Van Der Meer, J.R., Zehnder, A.J., and De Vos, W.M. (1991). Identification of a novel composite transposable element, Tn5280, carrying chlorobenzene dioxygenase genes of *Pseudomonas* sp. strain P51. *J. Bacteriol.* 173, 7077-7083.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PRZED UZYSKANIEM STOPNIA DOKTORA

PUBLIKACJE:

Bartosik D., M. Putyrski, L. Dziewit, E. Malewska, M. Szymanik, E. Jagiello, J. Lukaszik and J. Baj. 2008. Transposable modules generated by a single copy of insertion sequence *ISPme1* and their influence on structure and evolution of natural plasmids of *Paracoccus methylutens* DM12. *J. Bacteriol.* 190: 3306-3313.

Dziewit L., M. Jazurek, L. Drewniak, J. Baj and D. Bartosik. 2007. SXT conjugative element and linear prophage N15 encode novel type of toxin-antitoxin stabilizing systems homologous to the *tad-ata* module of *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. *J. Bacteriol.* 189: 1983-1997.

Badania dotyczyły przede wszystkim identyfikacji niescharakteryzowanej wcześniej grupy systemów stabilizujących, kodujących toksynę i antytoksynę, której archetypem jest moduł *tad-ata* z plazmidu pAMI2 *P. aminophilus* JCM 7686. Przeprowadzono analizy funkcjonalne czterech homologicznych *loci* z tej grupy, pochodzących z różnych elementów genetycznych, tj. z (i) plazmidu pAMI2 (*tad-ata*), (ii) elementu SXT *Vibrio cholerae* (s045-s044), (iii) bakteriofaga N15 *Escherichia coli* (*gp49-gp48*) oraz (iv) wyspy genomowej enterokrwotocznego szczepu *E. coli* O157:H7 EDL933 (Z3230-Z3231). W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, między innymi, że: (i) trzy spośród badanych elementów są w stanie stabilizować plazmidy testowe, jednak różnią się one zakresem gospodarzy, w których są funkcjonalne, (ii) geny wchodzące w skład badanych systemów TA tworzą operony, w których toksyna kodowana jest przez pierwszy gen operonu, (iii) wszystkie badane moduły TA zawierają dwa promotory o różnej aktywności, zlokalizowane, odpowiednio, powyżej genu toksyny (P1) oraz genu antytoksyny (P2), (iv) wszystkie badane toksyny rozpoznają cel komórkowy w *E. coli* i wywołują efekt bakteriostatyczny, przejawiający się zaburzeniem podziałów komórkowych, (v) indukcja antytoksyn systemów pochodzących z bakteriofaga N15 i elementu SXT umożliwia pełne odwrócenie efektu toksycznego, natomiast antytoksyny modułów plazmidu pAMI2 i wyspy genomowej EDL933, powodują powolny wzrost przeżywalności bakterii, nie są jednak w stanie w pełni odwrócić efektu bakteriostatycznego w *E. coli*, (vi) antytoksyny badanych modułów TA są degradowane przez różne proteazy komórkowe (Dziewit et al., 2007).

Prowadzono również badania mające na celu identyfikację i charakterystykę modułów transpozycyjnych (TMO) *P. methylutens* DM12, generowanych przez pojedynczą kopię sekwencji insercyjnej *ISPme1*. Wykazano, że transpozycja TMO może powodować rozległe zmiany w genomach bakterii, co zaobserwowano na przykładzie plazmidów pMTH1 i pMTH4 (Bartosik et al., 2008).

OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE PO UZYSKANIU STOPNIA DOKTORA

Prace prowadzone po uzyskaniu stopnia doktora miały charakter zarówno badań podstawowych, jak i aplikacyjnych, i dotyczyły zagadnień związanych z: (i) genomiką strukturalną i funkcjonalną ruchomych elementów genetycznych *Alphaproteobacteria*, (ii) genomiką strukturalną i funkcjonalną bakterii z rodzaju *Psychrobacter*, (iii) konstrukcją nowych narzędzi i układów biologicznych na potrzeby biotechnologii oraz (iv) mikrobiologią kliniczną.

GENOMIKA STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA RUCHOMYCH ELEMENTÓW GENETYCZNYCH ALPHAPROTEOBACTERIA

PUBLIKACJE HABILITANTA W TEMACIE:

Dziewit L. and D. Bartosik. 2015. Comparative analyses of extrachromosomal bacterial replicons, identification of chromids and experimental evaluation of their indispensability. Mengoni A., Galardini M. and Fondi M. (Editors). *Bacterial Pangenomics; Methods in Molecular Biology* 1231: 15-29. Springer Protocols/Humana Press, USA, New York.

Czarnecki J., L. Dziewit, L. Kowalski, M. Ochnio and D. Bartosik. 2015. Maintenance and genetic load of plasmid pKON1 of *Paracoccus kondratievae*, containing a highly efficient toxin-antitoxin module of the *hipAB* family. *Plasmid*. (w druku) doi:10.1016/j.plasmid.2015.02.003.

Dziewit L., K. Oscik, D. Bartosik and M. Radlinska. 2014. Molecular characterization of a novel temperate *Sinorhizobium* bacteriophage ΦLM21, encoding DNA methyltransferase with CcrM-like specificity. *J. Virol.* 88: 13111-13124.

Maj A., L. Dziewit, J. Czarnecki, M. Włodarczyk, J. Baj, G. Skrzypczyk, D. Giersz and D. Bartosik. 2013. Plasmids of carotenoid-producing *Paracoccus* spp. (*Alphaproteobacteria*) - structure, diversity and evolution. *PLoS ONE* 8: e80258.

Drewniak L., L. Dziewit, M. Cieczkowska, J. Gawor, R. Gromadka and A. Skłodowska. 2013. Structural and functional genomics of plasmid pSinA of *Sinorhizobium* sp. M14 encoding genes for the arsenite oxidation and arsenic resistance. *J. Biotechnol.* 164: 479-488.

Dziewit L., K. Kuczkowska, M. Adamczuk, M. Radlińska and D. Bartosik. 2011. Functional characterization of the type II Paml restriction-modification system derived from plasmid pAMI7 of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *FEMS Microbiol. Lett.* 324: 56-63.

Dziewit Ł. i D. Bartosik. 2011. Genomy prokaryotyczne w świetle analiz genomicznych (Prokaryotic genomes in the light of genomic analyses). *Post. Mikrobiol.* 50: 87-96.

Dziewit L., M. Dmowski, J. Baj and D. Bartosik. 2010. Plasmid pAMI2 of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 carries *N,N*-dimethylformamide degradation-related genes whose expression is activated by a LuxR family regulator. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 1861-1869.

Obiektem badań były bakterie z rodzajów *Paracoccus* oraz *Sinorhizobium*. Zidentyfikowano, dokonano adnotacji i przeanalizowano sekwencje 19 nieopisanych wcześniej plazmidów oraz genomu 1 bakteriofaga. Wybrane moduły genetyczne zidentyfikowanych MGE poddano następnie analizom funkcjonalnym.

W plazmidzie pKON1 z *P. kondratievae* zidentyfikowano oraz przeprowadzono analizy funkcjonalne bardzo wydajnego systemu stabilizującego (*hipAB*) typu toksyna-antytoksyna (Czarnecki et al., 2015). Liczne systemy toksyna-antytoksyna zidentyfikowano również w plazmidach bakterii z rodzaju *Paracoccus*, zdolnych do produkcji barwników karotenowych (Maj et al., 2013). Co ciekawe, w genomach tych plazmidów zidentyfikowano również niewielkie „wysepki” (ang. *plasmid islets*), niosące niekiedy moduły genetyczne o potencjalnym znaczeniu adaptacyjnym, np. gen kodujący pyrofosfokinazę GTP (Maj et al., 2013). Analizowano również moduły genetyczne plazmidów *P. aminophilus*, tj. (i) system restrykcji i modyfikacji typu II z plazmidu pAMI7 (określono jego specyficzność i rolę w stabilizacji plazmidu) (Dziewit et al., 2011) oraz (ii) moduł genetyczny z pAMI2 kodujący *N,N*-dimetyloformamidazę (DMFazę), enzym odpowiedzialny za rozkład toksycznego DMF. Wykazano, że ekspresja genów tego modułu jest zależna od aktywatora transkrypcji z rodziny LuxR i ulega indukcji w obecności DMF (Dziewit et al., 2010).

Bardzo ciekawym przykładem replikonu niosącego moduły o znaczeniu adaptacyjnym jest plazmid koniugacyjny pSinA z *Sinorhizobium* sp. M14, o szerokim zakresie gospodarzy. W plazmidzie tym zidentyfikowano geny kodujące enzymy warunkujące: (i) oporność na jony arsenu, kobaltu, cynku, kadmu i rtęci, (ii) utlenianie arseninów oraz (iii) transport fosforanów (i prawdopodobnie arsenianów). Obecność tych modułów ma zapewne kluczowe znaczenie dla adaptacji szczepu gospodarza, który wyizolowano z silnie skażonego arsenem środowiska (Drewniak et al., 2013).

Nową ścieżkę stanowią niedawno rozpoczęte analizy genomiczne bakteriofagów *Alphaproteobacteria*. Dotychczas zidentyfikowano, zsekwencjonowano i przeanalizowano genom faga ΦLM21 z *Sinorhizobium* sp. LM21. Przeprowadzono również analizy dwóch modułów genetycznych tego faga, kodujących, odpowiednio: (i) potencjalną chitynazę powodującą szybką lizę komórek bakteryjnych oraz (ii) metylotransferazę DNA o specyficzności identycznej z główną metylotransferazą komórkową CcrM, regulująca cykl komórkowy *Sinorhizobium* spp. (Dziewit et al., 2014).

Prowadzone badania stały się punktem wyjścia dla stworzenia pracy przeglądowej, w której opisano zagadnienia związane z genomiką bakterii i archeonów (Dziewit i Bartosik, 2011) oraz rozdziału w książce pt. „Bacterial Pangenomics”, w którym opisano metodologię związaną z analizami bioinformatycznymi ruchomych elementów genetycznych bakterii oraz z identyfikacją i analizą funkcjonalną chromidów (Dziewit i Bartosik, 2015).

GENOMIKA STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA BAKTERII Z RODZAJU *PSYCHROBACTER*

PUBLIKACJA HABILITANTA W TEMACIE:

Lasek R., L. Dziewit and D. Bartosik. 2012. Plasmid pP62BP1 of an Arctic strain of *Psychrobacter* sp. carries two highly homologous type II restriction-modification systems and a putative operon for the organic sulfates metabolism. *Extremophiles* 16: 363-376.

W ramach prowadzonych badań zidentyfikowano, zsekwencjonowano i przeprowadzono analizę plazmidu pP62BP1 z arktycznego szczepu *Psychrobacter* sp. W genomie tego plazmidu wyróżniono moduły konserwowanego rdzenia (moduł replikacyjny i stabilizacyjny), dwa homologiczne systemy restrykcji i modyfikacji typu II oraz moduł fenotypowy, którego geny kodują enzymy szlaku przemian reszt alkilowych siarczanów organicznych do acylo-CoA (Lasek et al., 2012).

Badania bakterii z rodzaju *Psychrobacter* są obecnie kontynuowane. Aktualnie są prowadzone analizy bioinformatyczne genomu szczepu DAB_AL43B, którego pełną sekwencję odczytano w trakcie prowadzonych prac badawczych.

KONSTRUKCJA NOWYCH NARZĘDZI I UKŁADÓW BIOLOGICZNYCH NA POTRZEBY BIOTECHNOLOGII

PUBLIKACJA HABILITANTA W TEMACIE:

Dziewit L., M. Adamczuk, M. Szuplewska and D. Bartosik. 2011. DIY series of genetic cassettes useful in construction of versatile vectors specific for *Alphaproteobacteria*. *J. Microbiol. Methods*. 86: 166-174.

ZGŁOSZENIA PATENTOWE HABILITANTA W TEMACIE:

Bartosik D., A. Maj, Ł. Dziewit, J. Czarnecki, M. Garstka, K. Gieczewska, E. Furmańczyk i J. Baj. 2014. Zgłoszenie patentowe międzynarodowe nr PCT/IB2015/051782 (z dnia 11.03.2015), pt. „Plazmid pCRT01 and construction thereof, novel bacterial strains, uses thereof and methods of producing carotenoids”.

Bartosik D., A. Maj, Ł. Dziewit, J. Czarnecki, M. Garstka, K. Gieczewska, E. Furmańczyk i J. Baj. 2014. Zgłoszenie patentowe krajowe nr P.407493 (z dnia 12.03.2014), pt. „Plazmid pCRT01 i jego konstrukcja, nowe szczepy bakteryjne, ich zastosowania oraz sposoby wytwarzania karotenoidów”.

Dziewit Ł., D. Bartosik, K. Romaniuk, Ł. Drewniak, A. Pyzik, A. Sobczak i L. Lipiński. 2014. Zgłoszenie patentowe krajowe nr P.408466 (z dnia 06.06.2014), pt. „Markery molekularne do identyfikacji oraz badania obecności konsorcjów metanogennych”.

W ramach prowadzonych badań skonstruowano i przetestowano ponad 100 nowych kaset genetycznych, użytecznych do tworzenia wektorów plazmidowych, umożliwiających prowadzenie analiz molekularnych w *Alphaproteobacteria*. Skonstruowane narzędzia genetyczne zawierają systemy replikacyjne oraz stabilizacyjne naturalnych plazmidów *Paracoccus* spp., odpowiednie geny markerowe, polilinkery ułatwiające klonowanie kaset oraz moduły umożliwiające wydajny transfer koniugacyjny (Dziewit et al., 2011).

W trakcie badań skonstruowano również nowy wektor plazmidowy niosący geny enzymów szlaku biosyntezy karotenoidów, który zapewnia bakteriom wydajną produkcję barwników karotenowych (zgłoszenia patentowe nr PCT/IB2015/051782 i P.407493). Opracowany został sposób wytwarzania (z wykorzystaniem skonstruowanego wektora) nowych szczepów bakteryjnych zdolnych do wydajnej produkcji karotenoidów oraz sposób wykorzystania otrzymanych szczepów w procesie produkcyjnym.

W ramach opracowywania nowych narzędzi biotechnologicznych skonstruowano również serię zdegenerowanych starterów do reakcji PCR, które amplifikują wytypowane geny - markery molekularne procesu metanogenezy. Ich zastosowanie umożliwi szybką detekcję archeonów metanogennych oraz analizę filogenetyczną zespołów metanogenów. Wynalazek znajduje zastosowanie nie tylko w badaniach środowiskowych z zakresu ekologii molekularnej, lecz ma również zastosowanie praktyczne, np. do monitoringu działania biogazowni rolniczych (zgłoszenie patentowe nr P.408466).

BADANIA Z ZAKRESU MIKROBIOLOGII KLINICZNEJ

PUBLIKACJE HABILITANTA W TEMACIE:

Jagielski T., H. Ignatowska, Z. Bakuła, L. Dziewit, A. Napiórkowska, E. Augustynowicz-Kopeć, Z. Zwolska and J. Bielecki. 2014. Screening for streptomycin resistance-conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Poland. *PLoS ONE* 9: e100078.

Sivanesan A., E. Witkowska, W. Adamkiewicz, L. Dziewit, A. Kamińska and J. Waluk. 2014. Nanostructured silver-gold bimetallic SERS substrate for selective identification of bacteria in human blood. *Analyst* 139: 1037-1043.

W ramach prowadzonych badań wykonano analizy bioinformatyczne danych epidemiologicznych. Badano rozpowszechnienie oraz częstość mutacji w genach *rrs*, *rpsL* i *gidB* w *Mycobacterium*

tuberculosis i wykazano korelacje występowania poszczególnych mutacji genetycznych z fenotypem oporności na streptomycynę (Jagielski et al., 2014).

Prace badawcze dotyczyły również opracowania nowej metody identyfikacji bakterii patogennych bezpośrednio w próbkach krwi pacjentów z zastosowaniem wzmocnionej spektroskopii Ramana (SERS, ang. *surface-enhanced raman spectroscopy*). Wstępne wyniki wskazują, że zaproponowana technika może znacznie przyspieszyć identyfikację patogenów (Sivanesan et al., 2014).

6. Dane bibliometryczne.

- Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się wszystkie publikacje habilitanta, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku prac z lat 2014/15 wykorzystano ostatnią dostępną w bazach wartość IF_{2013}) – **60,74**.
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje habilitanta – **615**.
- Liczba cytowań wszystkich publikacji habilitanta (wg bazy Web of Science) – **112**.
- Indeks Hirscha habilitanta (wg bazy Web of Science) – **5**.

Dziewit