



UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Zakład Genetyki Bakterii  
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Warszawa, 02.02.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Lipy  
pt. „Funkcja białka PssZ w regulacji procesów komórkowych bakterii symbiotycznej  
*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*”**

(“The function of the PssZ protein in regulation of cell processes of the symbiotic bacterium  
*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*”)

**wykonanej w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,**

**pod kierunkiem prof. dr hab. Moniki Janczarek**

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Lipy została przedstawiona w formie dwóch spójnych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports* (JCR), o sumarycznym współczynniku oddziaływania 7,514 (240 p. MNiSW). Pierwsza z prezentowanych prac ukazała się w 2018 roku w czasopiśmie *Genes*, a druga została opublikowana rok później (2019) w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*. Zamieszczone w rozprawie kopie ww. artykułów poprzedza kilka krótkich rozdziałów o układzie typowym dla klasycznych rozpraw doktorskich – znajduje się tu zatem (a) Streszczenie, w języku polskim i angielskim, (b) krótki Wstęp, stanowiący bardzo dobre wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy, (c) sprecyzowana Hipoteza oraz cel naukowy pracy, (d) krótkie Omówienie uzyskanych wyników, a także (e) Dyskusja, (f) Podsumowanie i wnioski oraz (g) spis literatury. Do rozprawy dołączono również spis stosowanych skrótów, oświadczenia współautorów opublikowanych prac, a także życiorys naukowy Doktorantki, który chociaż nie podlega ocenie, przynosi informacje świadczące o tym, że okres studiów doktoranckich Pani mgr Pauliny Lipy był bardzo owocny pod względem naukowym. Cała rozprawa została napisana zwięźle, dobrym językiem, oraz bardzo starannie opracowana od strony edytorskiej.

Obie prace oryginalne, stanowiące zasadniczą część rozprawy, są wieloautorskie – pierwsza liczy pięcioro, a druga troje autorów. W każdej z nich Doktorantka zajmuje pozycję pierwszego autora, która zwyczajowo rezerwowana jest dla głównego wykonawcy części doświadczalnej.

Według zapisu Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), rozprawę doktorską może stanowić „... samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowaniu koncepcji, wykonaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy”. W świetle załączonych oświadczeń współautorów obu ocenianych prac, Doktorantka odegrała dominującą rolę w przeprowadzeniu części eksperymentalnej opisanych w nich badań, a także miała znaczący wkład w planowanie prac badawczych, opracowanie metodyki, interpretację, dyskusję oraz opracowanie statystyczne uzyskanych wyników; w przypadku jednej z prac uczestniczyła również w pisaniu manuskryptu. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, nie mam żadnych wątpliwości, że włączenie tych prac do rozprawy było w pełni uprawnione.

W ocenianej rozprawie badaniom poddano szczep *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* – bakterii z grupy ryzobiów, wchodzącej w relacje symbiotyczne z roślinami bobowatymi. Bakteria ta, dzięki zdolności do efektywnego biologicznego wiązania azotu atmosferycznego zapewnia roślinie łatwo przyswajalne źródło tego pierwiastka, co ma także duże znaczenie praktyczne. Ważną rolę podczas interakcji symbiotycznych ryzobiów z gospodarzem roślinnym odrywają bakteryjne polisacharydy powierzchniowe, które są również niezbędne do prawidłowego funkcjonowania tych bakterii w środowisku glebowym. Zagadnienia związane z analizą genetycznych podstaw syntezy i transportu poliacharydów, a także z identyfikacją globalnych sieci regulacyjnych, z którymi powiązane są geny zaangażowane w biosyntezę tych związków, od wielu lat znajdują się w kręgu zainteresowań naukowych grupy badawczej prof. Moniki Janczarek, promotora ocenianej pracy. Badania przedstawione w rozprawie mgr Pauliny Lipy stanowią uzupełnienie i rozwinięcie tej tematyki, a co ważne, dotyczą ciekawego i niepoznanego dotąd w wystarczającym stopniu zagadnienia, jakim jest, ogólnie ujmując, udział potranslacyjnej modyfikacji białek w globalnej regulacji ekspresji genów u bakterii.

Punktem wyjścia w badaniach były wyniki mutagenезy transpozonowej przeprowadzonej w szczepie *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Rt24.2. Podejście to doprowadziło m.in. do wyselekcjonowania zmutowanego szczepu (Rt297), którego kolonie utraciły strukturę mukoidalną, charakterystyczną dla *R. leguminosarum*. Sugerowało to defekt w produkcji polisacharydów, dlatego szczep ten poddano dalszym analizom.

W pierwszym artykule zamieszczonym w rozprawie, zatytułowanym “*Mutation in the pssZ gene negatively impacts exopolysaccharide synthesis, surface properties, and symbiosis of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with clover”, przeprowadzono szczegółową analizę zmutowanego szczepu Rt297. Na wstępie określono miejsce integracji kasety transpozonowej w genomie, a tym samym zdefiniowano zinktywowany gen, kodujący potencjalną fosfatę serynowo-treoninową (STP). W dalszej kolejności przeprowadzono odpowiednie testy komplementacyjne dowodząc, że funkcja genu *pssZ* warunkuje mukoidalny wzrostu kolonii *R. leguminosarum*. Zasadnicza część

tej pracy opisuje jednak dogłębną charakterystykę zmutowanego szczepu, którą przeprowadzono w odniesieniu do szczepu dzikiego oraz skonstruowanych w tej pracy szczepów kontrolnych. Należy podkreślić dużą różnorodność wykorzystywanych technik i podejść eksperymentalnych, które pozwoliły m.in. na przeprowadzenie analiz jakościowych i ilościowych wytwarzanych egzopolisacharydów, zbadanie profili produkowanych lipopolisacharydów, określenie właściwości powierzchniowych komórek, w tym ich hydrofobowości, zdolności do agregacji i tworzenia biofilmu, a także zdolności do ruchu i wrażliwości na czynniki stresowe. Zbadano także topologię komórek bakteryjnych, wykorzystując do tego celu mikroskopię sił atomowych (AFM), a także przeprowadzono badania w układach roślinnych, które miały na celu sprawdzenie zdolności symbiotycznych zmutowanego szczepu.

Badania te przyniosły kilka istotnych obserwacji, które wytyczyły kierunek dalszych prac. Po pierwsze, zaobserwowano plejotropowy charakter zmian wywołanych mutacją w genie *pssZ*, co sugerowało rolę produktu tego genu, fosfatazy (STP), w potranslacyjnej modyfikacji białek zaangażowanych w przebieg różnych procesów komórkowych. Po drugie, wykazano, że mutacja w *pssZ* skutkowała nie tylko defektem we właściwościach fizjologicznych analizowanego szczepu, lecz także zaburzała znacząco jego relacje symbiotyczne z koniczyną, co wskazywało na udział tego genu w determinowaniu cech kluczowych dla biologii komórek *R. leguminosarum*.

Naturalną konsekwencją tych obserwacji było podjęcie prac mających na celu oszacowanie zmian na poziomie transkryptomu, spowodowanych inaktywacją genu *pssZ*. Wyniki tych badań przedstawiono w drugiej włączonej do rozprawy pracy, zatytułowanej "*Transcriptomic studies reveal that the Rhizobium leguminosarum serine/threonine protein phosphatase PssZ has a role in the synthesis of cell-surface components, nutrient utilization, and other cellular processes*".

W wyniku przeprowadzonych analiz transkryptomicznych szczepu dzikiego Rt24.2 oraz szczepu zmutowanego w genie *pssZ* (Rt297), Doktorantka uzyskała dużą ilość danych, które odpowiednio opracowała, dokonała ich analizy porównawczej, a następnie wyniki o znaczeniu statystycznym przedstawiła w syntetycznej i czytelnej formie. Poszczególne geny zostały przypisane do odpowiednich kategorii funkcjonalnych grup ortologów (COG), zaangażowanych w przebieg różnych procesów komórkowych. Pozwoliło to na wykazanie wpływu białka PssZ, pośredniego i/lub bezpośredniego, na ekspresję licznych genów zaangażowanych m.in. w kontrolę cyklu komórkowego, biogenezę osłon komórkowych, transdukcję sygnału, syntezę struktur zewnątrzkomórkowych, czy transport wewnątrzkomórkowy – a więc procesów istotnych zarówno dla funkcjonowania wolnożyjącej komórki bakteryjnej, jak i bakterii wchodzącej w symbiozę z partnerem roślinnym. Co ciekawe, w szczepie mutantu *pssZ* doszło do zmiany profilu ekspresji ok. 100 genów kodujących potencjalne regulatory transkrypcji, co tłumaczy rozległy zakres zaobserwowanych zmian.

Aby uwierzytelnić dane uzyskane w wyniku analiz RNASeq, Doktorantka przeprowadziła dodatkowe analizy eksperymentalne, w trakcie których potwierdziła m.in. zmianę aktywności promotorów wybranych genów w szczepie Rt297, wykazała również, że zmutowany szczep mniej efektywnie wykorzystuje niektóre węglowodany jako źródła węgla i energii, a także uzyskała dane wskazujące na udział białka PssZ w regulacji syntezy większej puli polisacharydów niż przypuszczano na podstawie wyników wstępnych analiz przedstawionych w pierwszej z opublikowanych prac.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej części rozprawy uwiaryściły globalny charakter zmian transkryptomu spowodowany analizowaną mutacją. Brak w komórce białka PssZ skutkowało zaburzeniem ekspresji (na znaczącym poziomie) ok. 1000 genów, co dowodzi, że fosfataza ta jest ważnym komponentem złożonej, globalnej sieci regulacji ekspresji genów *R. leguminosarum*. Uzyskane wyniki otwierają nowe perspektywy badawcze, które, jak zauważa sama Doktorantka, powinny być w przyszłości nakierowane na identyfikację białek docelowych dla fosfatazy PssZ, co pozwoliłoby zdefiniować rolę tej fosfatazy i precyzyjnie umiejscowić ją w sieci regulacyjnej analizowanego szczepu bakterii.

Obie włączone do rozprawy prace zostały opublikowane, podlegały więc wcześniej recenzji specjalistów i edytorów naukowych, zyskując ich pozytywne opinie. Nie mam do ich treści zastrzeżeń merytorycznych. Niżej przedstawiam jedynie kilka drobnych uwag i pytań, które mają głównie na celu zainicjowanie dyskusji podczas obrony rozprawy.

1. W kilku miejscach polskojęzycznej części rozprawy Doktorantka wspomina, że białko PssZ „wykazuje istotną homologię do bakteryjnych fosfataz serynowo-treoninowych” (str. 7, 16, 17), a w jednym (str. 15) pisze, że fosfatazy „wykazują wysoką homologię w obrębie domeny katalitycznej”. W mojej opinii „homologia” nie jest pojęciem wymiernym – nie może ona być zatem mniej lub bardziej istotna, wysoka lub niska. Geny lub białka bądź są homologiczne (na co wskazuje ich wspólne pochodzenie ewolucyjne i zachowana funkcja) bądź nie są. Jeśli porównaniu genów/białek chcemy przypisać wymierne wartości/określenia, powinniśmy mówić raczej o stopniu identyczności/podobieństwa sekwencji nukleotydowych lub aminokwasowych. Czy podziela Doktorantka to zdanie?

2. W rozprawie użyto terminu regulon do określenia ogółu genów, których ekspresja ulega znaczącym zmianom przy braku w komórce fosfatazy PssZ (regulon PssZ). Termin ten został wprowadzony już w latach 60 ubiegłego wieku, a jego klasyczna definicja odnosi się do genów i operonów znajdujących się pod bezpośrednią kontrolą wspólnego czynnika transkrypcyjnego. W przypadku fosfatazy spodziewamy się raczej działania pośredniego, poprzez modulację aktywności innych białek. Poprosiłbym o przedyskutowanie tego zagadnienia oraz podanie współczesnej definicji regulonu, która być może ewoluuje wraz z poznaniem coraz większej złożoności sieci regulacji ekspresji bakteryjnych genów. Czy np. w przypadku metylotransferazy, czy białka typu IHF, których

aktywności również powodują liczne zmiany w transkryptomie, jesteśmy uprawnieni do użycia terminu regulon?

3. W jednej z prac skonstruowano plazmid komplementacyjny pPL1 (z „dziką” wersją genu *pssZ*), którego wprowadzenie do zmutowanego szczepu Rt297 nie przywracało w pełni charakterystyki cech szczepu dzikiego, związanej z tempem wzrostu bakterii, tworzeniem biofilmu czy efektywnością tworzenia brodawek korzeniowych. Plazmid pPL1 występuje w komórkach bakteryjnych w liczbie ok. 20 kopii, co jest cechą wektorów z serii pBBR1-MCS. Czy analizując fenotypy szczepów niosących pPL1 uwzględniono zmianę dawki genu *pssZ* w komórce (ang. *gene dosage*)? Czy mogło to mieć wpływ na wspomniane wyżej różnice?

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawione badania prezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i ważne wątki do ogólnej wiedzy na temat złożoności sieci regulacji ekspresji genów *R. leguminosarum*. Należy podkreślić, że analizowane przez Doktorantkę białko PssZ jest pierwszym enzymem z grupy fosfataz serynowo-treoninowych, który scharakteryzowano u bakterii z rodziny *Rhizobiaceae*; jest to również pierwsza fosfataza (STP), dla której wykazano istotną rolę w regulacji syntezy bakteryjnych polisacharydów powierzchniowych. Co ważne, Pani mgr Paulina Lipa realizując kolejne zadania badawcze rozprawy wykorzystwała odpowiednie rozwiązania metodyczne, wykazując przy tym zdolność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz umiejętność analizy dużej ilości danych (w tym uzyskanych po zastosowaniu metod wysokoprzepustowych), dokonania ich syntezy i wyciągnięcia w pełni uprawnionych wniosków.

Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Zwracam się więc do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Pauliny Lipy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość poznawczą przeprowadzonych badań oraz ich opublikowanie w wysoko punktowanych periodykach, przedkładam wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.



prof. dr hab. Dariusz Bartosik