

Lublin, 10.02.2020

prof. dr hab. Magdalena Frąć
Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Badań Systemu Gleba-Roślina
Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej
ul. Doświadczalna 4
20-290 Lublin

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

Rozprawa doktorska mgr Pauliny Anny Lipy została wykonana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod opieką promotora prof. dr hab. Moniki Janczarek. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w dwóch publikacjach, które ukazały się w czasopismach *Genes* (IF₂₀₁₉ 3,331, punkty MNiSW 100) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₁₉ 4,183, punkty MNiSW 100/140).

1. Ocena problematyki badawczej rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Pauliny Anny Lipy koncentruje się na badaniach z obszaru mikrobiologii i genetyki, obejmując badania nad mechanizmami regulatorowymi bakterii symbiotycznych, posiadających zdolność współżycia z roślinami bobowatymi. Celem przeprowadzonych badań było określenie funkcji białka PssZ w regulacji procesów komórkowych bakterii symbiotycznej *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* w warunkach *ex planta* oraz *in planta*.

Tematyka badań podjętych przez Panią mgr Paulinę Annę Lipę jest aktualna i interesująca. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej mają w szczególności charakter badań podstawowych, przyczyniając się do pogłębienia wiedzy nad wpływem białka PssZ na funkcjonowanie komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Jednakże, ze względu na znaczenie bakterii z rodzaju *Rhizobium* w procesie biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w układzie symbiotycznym, prowadzone badania mają również wymiar praktyczny. Problem narastającej degradacji gleb i zanieczyszczenia środowiska, związany z niewłaściwym

stosowaniem i nadużywaniem nawozów sztucznych, głównie azotowych, stanowi poważne zagrożenie i sprawia, że badania nad interakcjami bakterii symbiotycznych z roślinami bobowatymi, nabierają jeszcze większego znaczenia aplikacyjnego, prowadząc do zmniejszenia zużycia bądź zastąpienia nawozów mineralnych naturalnymi bio-nawozami, opartymi o mikroorganizmy i ich metabolity. Pomimo tego, że na całym świecie prowadzone są badania nad symbiozą roślin bobowatych i bakterii brodawkowych, to ten obszar badawczy wymaga wciąż gruntownych badań, ponieważ proces nawiązywania symbiozy jest wieloetapowy i specyficzny gatunkowo, a ponadto zależy od wielu czynników środowiskowych. Szczegółowe poznanie wykształconych przez symbiotyczne bakterie glebowe mechanizmów regulatorowych, umożliwiających adaptację do zmieniających się warunków w niszy ekologicznej, pozwoliłoby na osiągnięcie pełnej kontroli nad procesem biologicznego wiązania azotu. Dlatego tematyka badań rozprawy doktorskiej wpisuje się w aktualny i rozwijający się intensywnie obszar badawczy. Badania nad układem symbiotycznym rośliny bobowate-rizobia dostarczają informacji zarówno pod względem poznawczym, wyjaśniając znaczenie białka PssZ w regulacji procesów komórkowych symbiotycznej bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, jak i aplikacyjnym, biorąc pod uwagę ogromne znaczenie ekonomiczne biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. W związku z powyższym, wybór tematyki recenzowanej rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadniony i celowy.

2. Formalna analiza rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Anny Lipy została przygotowana w formie manuskryptu, w sposób prawidłowy, typowy dla doktorskich prac eksperymentalnych. Wyniki rozprawy doktorskiej, które wchodziły w skład manuskryptu, zostały opublikowane w dwóch oryginalnych artykułach naukowych, które zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych:

- Lipa Paulina, Vinardell José-María, Kopcińska Joanna, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Janczarek Monika (2018). *Mutation in the pssZ Gene Negatively Impacts Exopolysaccharide Synthesis, Surface Properties, and Symbiosis of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with Clover. Genes (Basel). pii: E369. doi: 10.3390/genes9070369.
- Lipa Paulina, Vinardell José-María, Janczarek Monika (2019). *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. Int J Mol Sci 20(12). pii: E2905. doi: 10.3390/ijms20122905.

W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a z przedstawionych oświadczeń Doktorantki i współautorów wynika, iż Jej rola w przygotowaniu tych prac była wiodąca. Ponadto, z przedstawionych oświadczeń określających indywidualny wkład Doktorantki wynika, że miała Ona udział lub współudział w zaplanowaniu prac eksperymentalnych i opracowaniu metodyki badań, wykonaniu analiz genetycznych, badań dotyczących charakterystyki cech fenotypowych oraz własności symbiotycznych szczepów bakterii, określeniu topologii komórek bakteryjnych, wykonaniu izolacji i oznaczenia ilości polisacharydów powierzchniowych produkowanych przez szczepy, izolacji RNA, oznaczeniu aktywności enzymów, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników, ich graficznym i statystycznym opracowaniu oraz pisaniu manuskryptu, co potwierdza umiejętność prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę.

Publikacje umieszczone w rozprawie doktorskiej objęto wspólnym tytułem „***Funkcja białka PssZ w regulacji procesów komórkowych bakterii symbiotycznej Rhizobium leguminosarum bv. trifolii***”, a pracy złożonej z VI rozdziałów, nadano strukturę obejmującą: **Wstęp (I)**, w którym umieszczono charakterystykę bakterii *Rhizobium leguminosarum* oraz omówiono znaczenie transdukcji sygnałów z udziałem fosforylacji w adaptacji bakterii do warunków środowiskowych, **Hipotezę i cel pracy (II)**, **Omówienie wyników (III)**, w którym precyzyjnie odnoszono się do wyników opublikowanych w poszczególnych artykułach naukowych, **Dyskusję (IV)**, **Podsumowanie i wnioski (V)**, **Literaturę (VI)**. Poza tym, na początku manuskryptu umieszczono **wykaz skrótów używanych w rozprawie**, ułatwiający czytanie pracy, **streszczenie w języku polskim i angielskim**, a na końcu rozprawy umieszczono **pełne teksty publikacji wchodzących w skład rozprawy, życiorys naukowy Doktorantki oraz oświadczenia Doktorantki i Współautorów**. Oprócz tabel i rysunków znajdujących się w publikacjach naukowych, w treść rozprawy doktorskiej wkomponowano 1 tabelę oraz 5 barwnych rycin, które bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę podjętych badań. Praca w takim układzie liczy 160 stron. Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej jest precyzyjny i w pełni odpowiada jej treści.

3. Merytoryczna analiza rozprawy

Pierwszy rozdział rozprawy stanowi „Wstęp”, który jest jednocześnie gruntownym przeglądem literatury, w którym Doktorantka dokładnie przedstawiła zagadnienia związane z

tematyką rozprawy, w tym interakcje symbiotyczne pomiędzy roślinami bobowatymi i ryzobiami, podkreślając znaczenie zgodności genetycznej oraz wymiany molekuł sygnałnych pomiędzy kompatybilnymi partnerami. Doktorantka zaprezentowała ogólną charakterystykę bakterii należących do rodzaju *Rhizobium*, omówiła etapy nawiązywania symbiozy przez te bakterie z roślinami bobowatymi oraz znaczenie struktury genomów szczepów należących do rodzaju *Rhizobium* w adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, a także scharakteryzowała budowę i funkcje powierzchniowych polisacharydów bakterii z rodzaju *Rhizobium*. Kolejnym blokiem tematycznym wstępu jest podrozdział prezentujący znaczenie transdukcji sygnałów z udziałem fosforylacji w adaptacji bakterii do warunków środowiskowych. W podrozdziale tym omówione zostały modyfikacje potranslacyjne białek, ze szczególnym uwzględnieniem fosforylacji. Doktorantka przedstawiła bakteryjne mechanizmy fosforylacji, podkreślając w szczególności zagadnienie fosforylacji seryny i treoniny, które należą do jednych z najczęściej modyfikowanych aminokwasów w białkach organizmów żywych. Przedstawione we wstępie omówienie problematyki związanej z tematem rozprawy, jest ciekawe i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia przedstawione w pracy. Doktorantka nakreśliła problemy badawcze, związane z fizjologiczną rolą kinaz i fosfataz serynowo-treoninowych u bakterii, podkreślając, że nie były one dotychczas obiektem badań u bakterii symbiotycznych.

Stąd też, hipoteza i cel pracy wyznacza wyraźnie kierunek badań, związany z określeniem funkcji białka PssZ *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wykazującego istotną homologię do bakteryjnych fosfataz serynowo-treoninowych, w regulacji procesów komórkowych tej bakterii, podczas symbiozy z koniczyną łąkową oraz w warunkach występowania poza rośliną. Cel został sformułowany poprawnie i jednoznacznie, a cele szczegółowe określają zakres badań i odnoszą się jednocześnie do zastosowanych w badaniach metod analitycznych, co uważam za właściwe.

Omówienie wyników stanowi część pracy, w której Doktorantka prawidłowo omówiła efekty badań. Jest to rozdział napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały, a poszczególne podrozdziały odnoszą się do wspomnianych wcześniej, opublikowanych artykułów naukowych, tworząc powiązaną całość i wzajemnie się dopełniając. W podrozdziale pierwszym przedstawiono charakterystykę szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wykorzystanych do badań oraz białka kodowanego przez gen *pssZ*, które wykazało istotną homologię do fosfataz serynowo-treoninowych, odnosząc się do wyników zawartych w publikacji 1 (*Genes*). Podrozdział drugi, dotyczący analizy porównawczej profili

transkryptomicznych szczepu dzikiego (Rt24.2) i mutantu w genie *pssZ* (Rt297), odnosi się do wyników zawartych w publikacji 2 (*International Journal of Molecular Sciences*) i przedstawia wiele istotnych i wartościowych rezultatów. W mojej ocenie na szczególne podkreślenie zasługuje wykazanie przez Doktorantkę, że brak funkcjonalnego białka PssZ skutkuje obniżeniem ekspresji genów biorących udział w wielu procesach komórkowych, takich jak: kontrola cyklu komórkowego i podziału komórek, biogeneza osłony komórkowej, ruchliwość komórek, transdukcja sygnałów, synteza struktur zewnątrzkomórkowych oraz transport wewnątrzkomórkowy. W podrozdziale trzecim przedstawiono charakterystykę właściwości fenotypowych badanych szczepów, omówionych w obu wymienionych wyżej publikacjach. Najważniejszym osiągnięciem tego etapu prac badawczych w mojej ocenie było wykazanie, że brak funkcjonalnego białka PssZ wpływa na spowolnienie tempa wzrostu oraz wydłużenie czasu generacji bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. W ramach przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała również, że mutacja w genie *pssZ* wpływa na obniżenie zdolności wykorzystania niektórych mono- i disacharydów, co może mieć wpływ na konkurencyjność rizobiów w glebie i ich adaptację do różnych warunków środowiskowych. Ostatni podrozdział dotyczy charakterystyki interakcji symbiotycznych badanych szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną łąkową, a przedstawione w nim wyniki wskazują, że brak funkcjonalnego białka PssZ wpływa negatywnie na proces symbiozy bakterii z koniczyną łąkową, prowadząc do obniżenia efektywności i ilości tworzonych brodawek. Obszerny materiał badawczy zaowocował dużą ilością wyników, które omówiono i przedstawiono na licznych rysunkach oraz zestawiono w tabelach umieszczonych w poszczególnych artykułach naukowych. Uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje na temat charakterystyki szczepów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz wpływu białka PssZ na regulację procesów komórkowych tych bakterii.

Kolejny rozdział Dyskusja jest bardzo dobrze napisaną częścią całego opracowania i charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym. W tej części rozprawy Doktorantka przeprowadziła wnikliwą dyskusję uzyskanych rezultatów odnosząc się do wyników dostępnych w publikacjach naukowych innych badaczy, co świadczy o bardzo dobrym rozpoznaniu podjętej problematyki badawczej. Doktorantka udowodniła, że posiada szeroką wiedzę w zakresie tematu prowadzonych badań. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się również bardzo dobrą i wyważoną interpretacją uzyskanych wyników, podkreślając że gen *pssZ* pełni istotną rolę w regulacji procesów komórkowych symbiotycznej bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Merytoryczną część rozprawy kończy podsumowanie i wnioski. W tej części Doktorantka podsumowuje zakres badań, przeprowadzonych z wykorzystaniem szeregu analiz genetycznych, molekularnych, fenotypowych oraz doświadczeń roślinnych, które pozwoliły na uzyskanie wyników umożliwiających określenie roli białka PssZ w regulacji procesów komórkowych oraz interakcjach symbiotycznych z kompatybilnym gospodarzem roślinnym, oraz sformułowanie pięciu trafnych wniosków. Świadczy to o dobrze zaplanowanych badaniach, a także pracowitości Doktorantki i Jej biegłości w pracy laboratoryjnej. Na końcu pracy znajdują się pełne teksty opublikowanych przez Doktorantkę artykułów naukowych oraz literatura, obejmująca 47 pozycji (oraz 94 pozycje w pierwszej publikacji i 116 pozycji w drugiej publikacji), w większości z ostatnich 10 lat, co potwierdza aktualność podjętej tematyki badawczej.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się poniższe komentarze i zagadnienia do dyskusji, proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

- Czy mogłaby Pani omówić główne czynniki określające efektywność wiązania azotu w brodawkach korzeniowych, biorąc pod uwagę również wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej?
- Czy (a jeśli tak, to w jaki sposób) przeprowadzone przez Panią badania mogłyby przyczynić się do opracowania innowacyjnego bionawozu, który mógłby być wykorzystany w rolnictwie?

Rozprawa doktorska została przygotowana bardzo starannie, tekst został napisany jasno i przejrzysto, a dokumentacja graficzna i opisy zostały bardzo dobrze wykonane. W treści pracy znalazły się nieliczne, drobne błędy edytorskie i stylistyczne, które zostały zaznaczone w tekście rozprawy.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego, dotyczącego określenia funkcji białka PssZ w regulacji procesów komórkowych bakterii symbiotycznej *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Doktorantka zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki rozprawy, wykazała umiejętność samodzielnego wykonywania badań naukowych, opanowała obszerny warsztat badawczy, a także wykazała się zdolnością do omówienia, opracowania, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników. Dysertacja doktorska Pani mgr Pauliny Anny Lipy jest opracowaniem wnoszącym istotny wkład w rozwój nauk biologicznych, w szczególności w

zakresie interakcji bakterii symbiotycznych z roślinami bobowatymi. Recenzowaną rozprawę oceniam bardzo pozytywnie podkreślając jej wysoki poziom naukowy i wartość merytoryczną.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Anny Lipy spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz. 455), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do publicznej obrony.

Biorąc pod uwagę aktualność podjętej tematyki, potwierdzoną opublikowanymi wynikami przedstawionymi w rozprawie doktorskiej w międzynarodowych czasopismach naukowych oraz uwzględniając kompleksowość bardzo dobrze zaplanowanych badań, w których wykorzystano szereg nowoczesnych technik analitycznych, a także dużą wartość poznawczą uzyskanych wyników badań i ich znaczenie praktyczne odnoszące się do procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Magdalena Frąć
prof. dr hab. Magdalena Frąć

Lublin, 10.02.2020