

Lublin, 27 lipca 2022

Prof. dr hab. Monika Janczarek
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09
monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Tomasza Adama Przepióry

Tytuł rozprawy: Istotność wybranych elementów pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek (DsbA, DegP, DegS i FkpA) dla wirulencji i przetrwania warunków stresowych patogenu ziemniaka, bakterii *Dickeya solani*

(Importance of the selected elements of the extracytoplasmic protein quality control system (DsbA, DegP, DegS, FkpA) for virulence and survival under stress conditions of the potato pathogen, *Dickeya solani*)

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Tomasza Przepióry została wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej i Medycznej, Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (UG) pod kierunkiem promotora, Pani prof. dr hab. Joanny Skórko-Glonek oraz opieką naukową promotora pomocniczego, dr inż. Donaty Figaj.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr. inż. Tomasza Przepióry jest kontynuacją i rozwinięciem badań prowadzonych z dużym powodzeniem od wielu lat przez pracowników Wydziału Biologii UG, w tym zespół prof. Joanny Skórko-Glonek, które dotyczą molekularnych mechanizmów interakcji fitopatogennych bakterii z rodzaju *Dickeya* z ich roślinnymi gospodarzami. Bakterie te wywołują choroby, zwane „czarną nóżką” i „mokrą zgnilizną” na ziemniakach i innych roślinach uprawnych, co skutkuje dużymi stratami ekonomicznymi w rolnictwie. Z tych powodów podjęty temat badawczy jest bardzo ważny i stale aktualny, zarówno ze względów poznawczych, jak też dla efektywnej produkcji żywności.

Mgr Tomasz Przepióra, w trakcie prowadzenia swoich badań miał możliwość skorzystania z bogatego warsztatu metodycznego i dużego doświadczenia naukowego zespołu Pani Promotor, dzięki czemu uzyskał wiele interesujących i ważnych wyników.

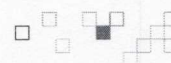
Przyczyniło się to do uzyskania rozprawy doktorskiej na wysokim poziomie naukowym i o dużych walorach poznawczych, jak też aplikacyjnych.

Ocena formalna rozprawy

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim i ma układ typowy dla tego rodzaju prac naukowych. Praca jest bardzo obszernym opracowaniem, który zawiera łącznie 273 strony. Co zasługuje na podkreślenie i docenienie, rozprawa została przygotowana bardzo starannie i szczegółowo, zarówno pod względem merytorycznym, jak również graficznym i edytorskim. Rozprawa zawiera wszystkie wymagane części: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, posumowanie i literaturę. W pracy zamieszczono liczne ryciny i tabele (łącznie 51 rycin i 14 tabel). Rozdział Wstęp jest bardzo obszerny (67 stron) i zawiera szczegółowy opis poszczególnych zagadnień związanych z tematem pracy. Cel pracy został sformułowany jasno i precyzyjnie, a w rozdziale Materiały i Metody zostały bardzo szczegółowo opisane materiały biologiczne, aparatura i metody wykorzystane w badaniach (42 strony). W tym miejscu chciałabym podkreślić bogaty warsztat metodyczny Doktoranta, który obejmuje szeroki repertuar technik badawczych z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej oraz spektrometrii mas. Równie obszerny jest rozdział Wyniki (75 stron), który zawiera szczegółowo opisane rezultaty badań uzyskanych przez mgr. T. Przepiórę. Jak zostało wskazane na końcu rozprawy, wyniki uzyskane przez Doktoranta zostały opublikowane w dwóch pracach eksperymentalnych, o sumarycznym współczynniku oddziaływania **IF 8,154 (Pkt MEiSW: 240)**:

1. **Przepióra, T.**, Figaj, D., Radzinska, M. *et al.* Effects of stressful physico-chemical factors on the fitness of the plant pathogenic bacterium *Dickeya solani*. *Eur. J. Plant Pathol.* **156**, 519–535 (2020); <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01902-z> (IF₂₀₂₀: 2,022, Pkt.100)
2. **Przepióra, T.**, Figaj, D., Bogucka, A., Fikowicz-Krosko, J., Czajkowski, R., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Skorko-Glonek, J. The periplasmic oxidoreductase DsbA is required for virulence of the phytopathogen *Dickeya solani*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(2):697 (2022); doi: 10.3390/ijms23020697 (IF₂₀₂₀: 6,132, Pkt.140)

Mgr T. Przepióra jest pierwszym autorem w tych pracach, co potwierdza istotną rolę Doktoranta w uzyskaniu wyników w nich opublikowanych. Szczególnie jedna z tych prac posiada wysoki współczynnik oddziaływania i wysoką punktację MEiSW, co wskazuje na jej znaczącą wartość naukową. Dodatkowo, co warto podkreślić, badania te zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki (projekt OPUS-7UMO-2014/13/B/NZ9/02021), którego promotor prof. J. Skórko-Glonek była kierownikiem. Rozdział



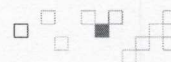
Dyskusja (17 stron) zawiera komentarze uzyskanych przez Doktoranta wyników w kontekście aktualnych danych literaturowych. Rozprawa zawiera też bardzo bogaty spis cytowanej literatury, obejmującej aż 460 prac, co należy uznać za imponujący wynik. Szkoda tylko, że prace te nie zostały ponumerowane w rozdziale Literatura, co znacznie ułatwiłoby recenzentowi analizę tych danych.

Podsumowując, rozprawa doktorska stanowi bardzo obszerne opracowanie naukowe, szczegółowo opisujące, zarówno teoretyczną część pracy, jak również stosowaną metodykę i wyniki uzyskane w ramach realizacji powierzonego zadania badawczego. Opisane wyniki zostały opublikowane w dwóch prestiżowych czasopismach z zakresu mikrobiologii i biologii molekularnej.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr. T. Przepióry zawiera bardzo obszerny Wstęp, w którym Autor opisał szczegółowo zagadnienia związane z tematem pracy, tj. choroby wywoływane przez bakterie *Dickeya*, ich cykl życiowy oraz czynniki wirulencji, systemy transportu, jak też adaptację do środowiskowych czynników stresowych. Opisane zostały aktualne dane dotyczące taksonomii tej grupy bakterii pektynolitycznych, ich czynniki wirulencji (tj. enzymy pektynolityczne, celulazy, proteazy, siderofory, chemotaksję i ruchliwość). W dalszej części tego rozdziału podano szczegółowe informacje na temat systemów sekrecji, białek uczestniczących w regulacji wirulencji oraz przystosowania tych bakterii do różnych czynników stresowych, takich jak: susza, stres termiczny, stres oksydacyjny i stres osmotyczny. Ostatnia część rozdziału Wstęp została poświęcona charakterystyce białek, będących elementami peryplazmatycznego systemu kontroli jakości białek (SKJB). Zostały opisane szczegółowo oksydoreduktazy disiarczkowe Dsb, proteazy DegP i DegS, izomerazy cis-trans peptydyloprolinowe i białko opiekuńcze Skp. Opis kolejnych zagadnień we Wstępie prowadzi w jasny i konsekwentny sposób do sformułowania celu badań.

Celem rozprawy było ustalenie roli wybranych elementów systemu SKJB w adaptacji bakterii *D. solani* do różnych czynników stresowych oraz w interakcji z gospodarzem roślinnym. Dotychczasowe dane literaturowe wskazywały na brak informacji o białkach systemu SKJB u bakterii *D. solani*. Stąd podjęcie tego celu badawczego przez Pana mgr. T. Przepiórę było w pełni uzasadnione. Cel ten został w pełni zrealizowany poprzez wykonanie pięciu zadań cząstkowych, obejmujących kolejno: konstrukcję szczepów pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących wybrane białka systemu SKJB, określenie wrażliwości otrzymanych mutantów na wybrane czynniki stresowe (tj. podwyższoną temperaturę,

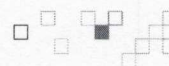


wysokie stężenie osmotolitów jonowych i niejonowych, obecność H_2O_2 i niskie pH), określenie wpływu mutacji na infekcyjność *D. solani* i wytwarzanie czynników wirulencji oraz identyfikację białek i procesów komórkowych zależnych od SKJB. Do badań wybrano cztery elementy tego systemu, tj. proteazy serynowe DegP i DegS, oksydoreduktazę disiarczkową DsbA oraz izomerazę peptydyloprolinową FkpA.

We wstępnej części badań określono zdolności adaptacyjne szczepu dzikiego *D. solani* IPO2222 do różnych stresów abiotycznych. W badaniach wykorzystano trzy metody pozwalające na ustalenie tempa wzrostu bakterii za pomocą gęstości optycznej hodowli płynnych, określenie żywotności komórek za pomocą liczby jednostek tworzących kolonie (CFU) na podłożu stałym i analizę integralności błon komórkowych z użyciem barwników fluorescencyjnych (jodek propidyny (IP) dla martwych i SYTO9 dla żywych komórek; tzw. test żywe/martwe komórki). Ustalono, że faza logarytmiczna dla szczepu kontrolnego IPO2222 występuje po 4,5, a wczesna faza stacjonarna po 16 godzinach prowadzenia hodowli. Zbadano przystosowanie *D. solani* do stresu termicznego. Nie wykazano wpływu podwyższonej temperatury ($37^\circ C$) na wzrost *D. solani* w porównaniu do temperatury optymalnej ($30^\circ C$) (a nawet zaobserwowano zwiększenie wzrostu), niezależnie od dostępności tlenu. Natomiast temperatura $40^\circ C$ spowodowała zahamowanie wzrostu we wszystkich testowanych wariantach. Bakterie nie tworzyły też kolonii na podłożu stałym w $40^\circ C$ w warunkach mikrotlenowych (6%).

Kolejnym badanym czynnikiem był stres osmotyczny (solny). Stosując parametr CFU, nie zaobserwowano negatywnego wpływu 0,8 M NaCl na liczbę bakterii w hodowli, natomiast stosując barwniki fluorescencyjne zaobserwowano istotny wpływ tego stężenia soli już po 1 godzinie traktowania komórek hodowanych w temp. $37^\circ C$, zarówno w fazie logarytmicznej, jak i stacjonarnej. Również na stałym podłożu szczep ten wykazał dużą wrażliwość na NaCl, gdyż tworzył CFU tylko na podłożu zawierającym maksymalnie 0,3 M NaCl. Stąd, nasuwa się pytanie jak wytłumaczyć różnice we wrażliwości tego szczepu zaobserwowane przy zastosowaniu odmiennych technik badawczych?

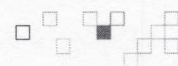
Ponadto, zbadano znaczenie stresu osmotycznego niejonowego (0,3 M sacharozy), stresu kwasowego (pH 5) i stresu oksydacyjnego (H_2O_2). Nie wykazano negatywnego wpływu zastosowanego stężenia sacharozy oraz pH na wzrost i przeżywalność szczepu dzikiego. Natomiast zaobserwowano wysoką wrażliwość tego szczepu na H_2O_2 (1 mM w hodowlach płynnych). Określenie profilu wrażliwości szczepu dzikiego *D. solani* IPO2222 na wymienione czynniki stresowe pozwoliło na scharakteryzowanie i porównanie zdolności adaptacyjnych szczepów zawierających mutacje w genach kodujących białka systemu SKJB.



Dla zrealizowania tego zadania mgr T. Przepióra przeprowadził złożone i czasochłonne serie klonowań z zastosowaniem różnorodnych technik molekularnych dla uzyskania szczepów pochodnych *D. solani* IPO2222 z mutacjami w genach *dsbA*, *degP*, *degS* i *fkpA*. Następnie wykonał bardzo dużą liczbę oznaczeń i pomiarów z wykorzystaniem wielu próbek i stosowanych wariantów. Należy docenić ogrom pracy włożony przez Doktoranta dla uzyskania wyników z tej części badań. Na podstawie tych analiz mgr T. Przepióra wykazał, że inaktywacja genów *degP*, *degS* i *fkpA* nie spowodowała istotnych zmian wrażliwości tych szczepów na większość testowanych warunków stresowych w porównaniu do szczepu dzikiego IPO2222 (z wyjątkiem stresu solnego i termicznego w przypadku mutantu *dsbA* oraz zwiększonej wrażliwości na H₂O₂ w fazie log. wzrostu mutantu *degP*).

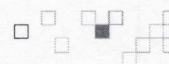
W kolejnych etapach badań mgr T. Przepióra sprawdził wpływ mutacji w badanych genach na skuteczność wywoływania infekcji roślin. Badania prowadzono na naturalnym gospodarzu - ziemniaku (*Solanum tuberosum*) (rośliny i bulwy) i modelu liścia cykorii (*Cichorium intybus*). Doktorant poczynił bardzo ciekawe obserwacje potwierdzając, że brak funkcjonalnych genów *dsbA* i *degS* obniżał wirulencję *D. solani* we wszystkich zastosowanych modelach infekcyjnych. Natomiast efekty mutacji w genach *degP* i *fkpA* nie odbiegały istotnie od efektów zaobserwowanych dla szczepu kontrolnego. Realizacja zadania dotyczącego wyznaczników wirulencji szczepu dzikiego IPO2222 i mutantów *dsbA*, *degP*, *degS* oraz *fkpA* dostarczyła kolejnych ciekawych obserwacji, że większość mutantów nie wykazywała różnic w produkcji enzymów degradujących ścianę komórek roślinnych, jak też ruchliwości komórek. Jedynie szczep z mutacją w genie *dsbA* charakteryzował się obniżoną aktywnością pektynolityczną i celulolityczną, zmniejszoną syntezą sideroforów i ruchliwością obu typów (tj. pływania i pełzania). Wyniki badań uzyskane przez Doktoranta sugerują, że wytypowane do analizy geny (z wyjątkiem *dsbA*) nie stanowią istotnych elementów systemu kontroli jakości białek u *D. solani* i/lub geny te mają swoje funkcjonalne paralogi i/lub działanie tych białek może być synergiczne. Jakże mogą być wyjaśnienia lub inne przyczyny takich obserwacji? Czy znane są dane literaturowe na temat funkcji białek Deg, Fkp i Dsb u innych pokrewnych gatunków bakterii?

Z wymienionych powyżej powodów, mgr T. Przepióra skupił się w dalszych etapach swoich badań nad ustaleniem globalnych zmian w poziomach różnych białek komórkowych spowodowanych mutacją w genie *dsbA*. Wyniki uzyskane w ramach realizacji tej części badań uważam za szczególnie wartościowe i interesujące, czego dodatkowym potwierdzeniem było opublikowanie ich w wysoko punktowanym czasopiśmie *Int. J. Mol. Sci.* w 2022 r.



Mgr T. Przepióra uzyskał bardzo ciekawe i ważne wyniki dotyczące profili białkowych szczepu dzikiego *D. solani* i szczepu zawierającego mutację w genie *dsbA*. Na podstawie analiz porównawczych proteomów całych komórek oraz sekretomów tych szczepów z wykorzystaniem techniki SWATH-MS (chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie akwizycji zależnej od danych) wykazano znaczące różnice ilościowe dla 45 białek spośród 607 białek zidentyfikowanych w proteomie *D. solani* (przy ustalonym kryterium odcięcia $p < 0,05$ i krotności zmian $< 0,5$ a $> 2,0$). Co ciekawe, wśród nich znalazły się białka (Tab. 12) związane z procesami chemotaksji i ruchliwości (m.in. CheA, CheV, CheW, FliC), adhezji (OmpW i OmpX), odpowiedzi na stres (GroES, RecA, GshB), metabolizmu podstawowego, syntezy białek (LeuA, HisD, TrpS) i biogenezy osłon komórkowych (MurC, BamA). Spośród białek SKJB, wykazano zwiększoną trzykrotnie ilość białka DegP w proteomie mutantu *dsbA* w porównaniu do proteomu szczepu dzikiego. Wykazane zmiany ilościowe białek w proteomach korelowały z wcześniej opisanymi różnicami we własnościach fenotypowych tych szczepów (m.in. obniżoną ruchliwością mutantu *dsbA*). Następnie badania te poszerzono o aspekt odpowiedzi tych bakterii na stres oksydacyjny (H_2O_2). Uzyskano kolejne istotne wyniki. Mianowicie, wykazano, że H_2O_2 spowodował zwiększenie ilości aż 51 białek, natomiast obniżenie ilości 13 białek w szczepie dzikim. Wśród białek o podwyższonym poziomie, największą grupę stanowiły białka zaangażowane bezpośrednio w reakcję obronną przed ROS i uogólnioną reakcją na stres (m.in. katalaza KatG i dysmutaza nadadtlenkowa). Uważam za bardzo interesujące wyniki uzyskane dla mutantu *dsbA*, które potwierdziły znacznie słabszą odpowiedź tego szczepu na stres oksydacyjny. Różnice ilościowe wykazano jedynie dla 15 białek (wśród nich zidentyfikowano KatG, dysmutazę nadadtlenkową i białko Dps).

W dalszym etapie badań poddano szczegółowej analizie porównawczej sekretom obu szczepów. Było to w pełni uzasadnione ze względu na fakt, iż postulowana funkcja biologiczna DsbA to oksydaza disiarczkowa, uczestnicząca w tworzeniu stabilnej struktury zewnątrzkomórkowych białek. W mojej ocenie, wyniki tej części badań, choć zaskakujące, są bardzo ciekawe. Wykazano bowiem, że (1) sekretom *D. solani* IPO2222 zawiera aż 573 białek i (2) sekretom mutantu *dsbA* różni się poziomem aż 183 białek od sekretomu szczepu dzikiego. Szczegółowa analiza porównawcza tych proteomów pokazała drastyczne obniżenie ilości wielu enzymów istotnych dla wirulencji w szczepie z brakiem funkcjonalnego białka DsbA (m.in. 6 liaz PGA, liazy pektynowej, metyloesterazy pektynowej PemA, glukuronosyloksylanazy XynC, proteazy PrtA, białek związanych z ruchliwością i chemotaksją – CheW i CheY, białek FlgB, C, D, E, F, K, L, M i białek FliC, D, E, K). Ponadto,



wykryto obecność niektórych białek wewnątrzkomórkowych w sekretomie mutantu *dsbA*, co wskazywało na zaburzenia integralności błon komórkowych tego szczepu. Obserwacje te zostały potwierdzone dodatkowo w testach wrażliwości na SDS i jodek propidyny. Wyniki otrzymane przez mgr. T. Przepiórę potwierdziły, że białko DsbA jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania błony zewnętrznej bakterii *D. solani*. W tym miejscu, chciałabym zapytać jakie mogą być możliwości biotechnologicznego wykorzystania informacji uzyskanych w ramach tej rozprawy w rolnictwie i/lub przemyśle spożywczym?

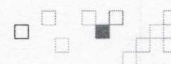
Podsumowując, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr. Tomasza Przepiórę, złożoność i czasochłonność wielu eksperymentów i analiz. Dzięki dużemu zaangażowaniu, sumienności, wytrwałości i pracowitości Doktorant zgromadził bardzo dużą ilość wartościowych wyników oraz poczynił wiele ciekawych obserwacji.

Spośród nich, za najważniejsze osiągnięcia tej rozprawy uważam:

- 1) otrzymanie szczepów pochodnych *D. solani* IPO2222 zawierających mutacje w genach *dsbA*, *degP*, *degS* i *fkpA* oraz szczepu z komplementacją mutacji *dsbA*
- 2) porównanie profili wrażliwości szczepu dzikiego IPO2222 i szczepów zawierających zinktywowane geny *dsbA*, *degP*, *degS* i *fkpA* na różne stresy abiotyczne
- 3) ustalenie wpływu mutacji w *dsbA*, *degP*, *degS* i *fkpA* na tworzenie czynników wirulencji oraz efektywność infekcji roślin
- 4) scharakteryzowanie proteomu i sekretomu szczepu dzikiego *D. solani* IPO2222 i mutantu *dsbA* w warunkach standardowej hodowli i w odpowiedzi na stres oksydacyjny
- 5) potwierdzenie istotności białka DsbA w wirulencji *D. solani*, adaptacji do stresów środowiskowych i prawidłowego funkcjonowania błony zewnętrznej tej bakterii.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Tomasza Przepióry stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza Jego ogólną wiedzę i umiejętność prowadzenia badań naukowych. Wyniki uzyskane w ramach tej rozprawy doktorskiej przyczyniły się do istotnego pogłębienia wiedzy na temat zdolności adaptacyjnych *Dickeya solani* do stresów środowiskowych oraz roli systemu SKJB w funkcjonowaniu tej bakterii w warunkach *ex planta* oraz w interakcji z



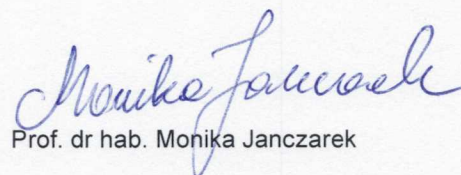
gospodarzem roślinnym. W mojej ocenie, rozprawa ta spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. Tomasza Przepiórę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Jednocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres prowadzonych badań, wartość naukową uzyskanych wyników oraz opublikowanie ich w dwóch pracach, w tym w wysoko punktowanym czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₀ 6,132, Pkt.140), w których mgr Tomasz Przepióra jest pierwszym autorem, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

- 1) **Przepióra, T.**, Figaj, D., Radzinska, M. *et al.* Effects of stressful physico-chemical factors on the fitness of the plant pathogenic bacterium *Dickeya solani*. *Eur. J. Plant Pathol.* **156**, 519–535 (2020); <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01902-z> (IF₂₀₂₀: 2,022, Pkt.100)
- 2) **Przepióra, T.**, Figaj, D., Bogucka, A., Fikowicz-Krosko, J., Czajkowski, R., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Skorko-Glonek, J. The periplasmic oxidoreductase DsbA is required for virulence of the phytopathogen *Dickeya solani*. *Int. J. Mol. Sci.* 23(2):697 (2022); doi: 10.3390/ijms23020697 (IF₂₀₂₀: 6,132, Pkt.140)

W uzasadnieniu, wyniki uzyskane przez mgr. T. Przepiórę dotyczące charakterystyki proteomów i sekretomów szczepu dzikiego IPO2222 i szczepu ze zinaktywowanym genem *dsbA*, hodowanych w warunkach standardowych i w odpowiedzi na stres oksydacyjny, jak też potwierdzenie istotności białka DsbA w wirulencji *D. solani* i adaptacji tej bakterii do stresów środowiskowych, uważam za bardzo cenne i o dużym znaczeniu poznawczym, które istotnie przyczyniły się do lepszego zrozumienia funkcjonowania tej grupy bakterii fitopatogennych.



Prof. dr hab. Monika Janczarek

