

„Istotność wybranych elementów pozacytoplazmatycznego systemu kontroli jakości białek (DsbA, DegP, DegS i FkpA) dla wirulencji i przetrwania warunków stresowych patogenu ziemniaka, bakterii *Dickeya solani*”
mgr inż. Tomasz Przepióra

Bakterie fitopatogenne stanowią istotny czynnik ograniczający wydajność produkcji w sektorze rolniczym. Ziemniak (*Solanum tuberosum*), będący jedną z kluczowych roślin uprawnych, jest narażony na infekcję bakteriami z grupy „Soft Rot Pectobacteriaceae” (SRP), do której należą gatunki z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Nowo wyodrębniony gatunek, *Dickeya solani*, jest istotną przyczyną strat w uprawach ziemniaków w wielu europejskich krajach, a także w Gruzji, Turcji i Izraelu. Objawami choroby spowodowanej przez przedstawicieli grupy SRP, w tym *D. solani*, jest mokra zgnilizna bulwy, będąca efektem degradacji ścian komórkowych i dezintegracji tkanki roślinnej, a także czarna nóżka, czyli postępujące od strony bulwy gnicie łodygi. Kluczowymi czynnikami wirulencji bakterii SRP są enzymy degradujące ścianę komórkową (PCWDE). *D. solani* dysponuje szerokim arsenalem enzymów pektynolitycznych, których aktywność skierowana jest na pektyny i kwas poligalakturonowy budujące ściany komórkowe gospodarza. Inne enzymy wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium* biorące udział w rozkładzie ścian komórkowych to celulazy i proteazy. Do wydajnej infekcji organizmu gospodarza wymagane są także ruchliwość i chemotaksja oraz zdolność do pobierania jonów metali, głównie żelaza.

W toku cyklu życiowego bakterie *D. solani* narażone są na szereg czynników stresogennych, obejmujących między innymi podwyższoną temperaturę, obecność reaktywnych form tlenu, zmiany pH środowiska i stres osmotyczny. Na stres środowiskowy narażone są szczególnie peryferyjne obszary komórki bakteryjnej - peryplazma i błony komórkowe. W wyniku działania niekorzystnych czynników często dochodzi do zaburzeń w strukturze białek, co może doprowadzić do utraty pełnionych przez nie funkcji, a w dalszych etapach do akumulacji agregatów białkowych. Aby temu przeciwdziałać, wzmożonej aktywności ulegają elementy systemu kontroli jakości białek (SKJB). Są wśród nich białka wspomagające zwijanie (białka opiekuńcze oraz katalizatory zwijania białek) oraz proteazy, degradujące białka o niewłaściwych strukturach. Peryplazmatyczne elementy SKJB zostały dokładnie scharakteryzowane u bakterii modelowej *Escherichia coli*. Natomiast wiedza na temat roli wspomnianych białek u bakterii fitopatogennych jest zdecydowanie mniejsza. W przypadku *D. solani* brak było doniesień na ten temat.

Celem niniejszej pracy było określenie istotności wybranych elementów peryplazmatycznego SKJB, obejmujących oksydoreduktazę disiarczkową DsbA, proteazy DegP i DegS oraz izomerazę peptydylo-prolinową FkpA, na zdolność do wzrostu bakterii *D. solani* w warunkach stresowych, wytwarzanie wyznaczników wirulencji i skuteczność wywołania objawów infekcji w roślinie.

W pierwszym etapie uzyskano zmutowane szczepy *D. solani*, w których przeprowadzono inaktywację genów kodujących wymienione powyżej białka poprzez przerwanie ich ciągłości kasetą warunkującą oporność na antybiotyk. W przypadku większości badanych mutantów nie zaobserwowano znaczących różnic we wrażliwości na pojedyncze czynniki stresowe w stosunku do bakterii niezmutowanych. Jedynie zastosowanie kombinacji stresów, np. solnego i termicznego miało bardziej negatywny wpływ na bakterie pozbawione elementów SKJB. Obserwowane różnice nie były jednak duże. Wynik ten może świadczyć o możliwości wzajemnego zastępowania się poszczególnych elementów SKJB u *D. solani*. Następnie stosując różnorodne modele roślinne (całe bulwy ziemniaka lub plastry, liście cykorii, rośliny ziemniaka z kultur *in vitro* oraz ziemniaki uprawiane w doniczkach) zbadano zdolność zmutowanych szczepów do infekowania oraz wywoływania efektów chorobowych. Spośród badanych mutantów tylko *D. solani dsbA:cm* wykazywał znacząco obniżoną wirulencję. Mutacja w genie *degS* obniżała zdolność do infekcji bardzo nieznacznie, a mutacje w genach *degP*

i *fkpA* nie miały wpływu na infekcyjność *D. solani*. Z tego względu w dalszych badaniach skupiono się na efektach braku DsbA u *D. solani*. Dokładnie zbadano zdolność *D. solani dsbA:cm* do produkcji funkcjonalnych czynników wirulencji, analizując aktywność wydzielanych PCWDE, ruchliwość komórek i ilość pozakomórkowych sideroforów. Okazało się, że szczep ten charakteryzował się bardzo niską aktywnością pektynaz i celulaz, silnie ograniczoną ruchliwością i znikomą produkcją sideroforów.

Aby lepiej poznać mechanizmy, w których uczestniczy białko DsbA, przeprowadzono ilościowe analizy proteomiczne SWATH-MS przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Okazało się, że mutacja *dsbA* doprowadziła do wywołania w komórce *D. solani* zmian o charakterze plejotropowym, których efektem było nie tylko obniżenie poziomu wydzielanych czynników wirulencji związanych z ruchliwością i degradacją ściany komórki roślinnej, lecz także indukcją systemów odpowiedzi na stres. Zaobserwowane zmiany wskazywały na zaburzenia homeostazy peryplazmy i błon komórkowych u *D. solani dsbA:cm*, o czym może świadczyć podwyższony poziom białek stresowych związanych z systemami stresowymi zależnymi od czynników σ^E , Cpx i Rcs, a także zmiany poziomu niektórych enzymów głównych szlaków metabolicznych, których zadaniem jest dostarczanie energii, siły redukującej i prekursorów do biosyntezy w celu przywrócenia równowagi w tym obszarze komórki. Interesującą obserwacją u mutantu *dsbA* była podwyższona zawartość grupy białek związanych z odpowiedzią na stres w obrębie cytoplazmy. Wskazuje to, że efekty braku DsbA nie ograniczają się do obszarów pozacytoplazmatycznych, lecz mają wpływ na funkcjonowanie całej komórki bakteryjnej. Ponadto, analiza składu sekretomu mutantów *dsbA* wykazała obecność znacznej ilości białek komórkowych, co sugerowało zaburzenia integralności błon komórkowych. Przypuszczenie to zostało potwierdzone, komórki *D. solani dsbA:cm* charakteryzowały się wyższą wrażliwością na detergent dodecylsulfian sodu.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują, iż brak jednego z testowanych elementów peryplazmatycznego SKJB nie wpływa znacząco na zdolność do wzrostu i przetrwania warunków stresowych u bakterii *D. solani*. Spośród badanych czynników zwijania białek, funkcje pełnione przez oksydazę DsbA okazały się niezbędne do wydajnej infekcji i wywołania objawów chorobowych u roślinnego gospodarza przez *D. solani*.