



**UNIwersYTET WARSZAWSKI  
WYDZIAŁ BIOLOGII**

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA  
TEL: (+22) 55-41-404, FAX: (+22) 55-41-402



prof. dr hab. Dariusz Bartosik  
Zakład Genetyki Bakterii  
Instytut Mikrobiologii  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 07.09.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kaczyńskiej  
pt. "Molecular determinants in the interaction of plant pathogenic bacteria  
from the species *Dickeya solani* and *Pectobacterium artrosepticum* under  
different temperatures"**

"Identyfikacja i charakterystyka genów indukowanych w komórkach bakteryjnych  
patogenów roślin z gatunków *Dickeya solani* i *Pectobacterium artrosepticum* w różnych  
temperaturach"

Promotor rozprawy: prof. dr hab. Ewa Łojkowska  
Promotor pomocniczy: dr hab. Robert Czajkowski

Bakterie mają zdolność szybkiej adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Zmiany o charakterze adaptacyjnym są zwykle inicjowane na poziomie transkrypcji poprzez aktywację bądź represję genów zaangażowanych w różne procesy metaboliczne. Zakres tych zmian bywa bardzo różny i jest zależny zarówno od rodzaju sygnałów środowiskowych, jak i specyficznych cech danego mikroorganizmu. W przypadku bakterii patogennych, sygnały te mogą również prowadzić do aktywacji genów zaangażowanych w proces wirulencji.

Oceniana rozprawa wpisuje się w ten nurt tematyczny, dotyka bowiem zjawiska termoregulacji ekspresji genów. Organizmami modelowymi w badaniach były szczepy bakterii patogennych z gatunków *Dickeya solani* i *Pectobacterium artrosepticum*, stanowiące czynnik etiologiczny często występujących chorób ziemniaka. Praca ta została wykonana w zespole badawczym prof. Ewy Łojkowskiej, w którym biologia bakterii pektynolitycznych jest jednym z tematów wiodących, a badania zostały sfinansowane z grantu Iuventus Plus (MNiSW), kierowanego przez dr. hab. Roberta Czajkowskiego – promotora pomocniczego rozprawy.

## Ocena układu, zawartości i formalnej strony rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa została przygotowana w języku angielskim w formie spójnego tematycznie dzieła. Ma ona klasyczny układ i jest podzielona na 7 głównych rozdziałów, obejmujących Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Dyskusję, Wnioski i Bibliografię. Ponadto w pracy zamieszczono Streszczenie (również w języku polskim), a także Załączniki, w których przedstawiono szczegółowe dane charakteryzujące uzyskane w tej pracy zmutowane szczepy bakterii. W rozprawie zamieszczono łącznie 20 tabel (w tym 12 w załącznikach) i 30 rycin, których spis przedstawiono w początkowej części pracy.

Wstęp rozprawy obejmuje 26 stron. Pierwsza jego część, po przedstawieniu danych statystycznych na temat upraw ziemniaka w Europie, koncentruje się na opisie wybranych patogenów bakteryjnych – *Dickeya solani* i *Pectobacterium artrosepticum*, które, jak wcześniej wspomniano, są częstą przyczyną chorób tej rośliny. Trzy kolejne rozdziały opisują (i) wpływ czynników środowiskowych na choroby roślin, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zmian klimatycznych i globalnego ocieplenia na dystrybucję szczepów *Dickeya* spp. i *Pectobacterium* spp., (ii) molekularnych sensorów bakterii wyczuwających zmiany termiczne w środowisku oraz (iii) przykłady ilustrujące wpływ temperatury na regulację ekspresji genów odpowiadających za wirulencję bakterii w organizmach eukariotycznych. Wstęp jest dobrze skomponowany. Zawarte w nim informacje są ułożone w logiczny ciąg zmierzający bezpośrednio do jednoznacznie postawionego celu naukowego. Jedynym moim zastrzeżeniem do tej części rozprawy jest brak opisu niektórych elementów przedstawionych na rycinie 6 oraz odwołań w tekście do poszczególnych paneli tej ryciny.

W kolejnym rozdziale rozprawy opisano materiały wykorzystane w badaniach oraz metodykę prac eksperymentalnych, obejmującą podejścia mikrobiologiczne, biochemiczne i genetyczne.

Wyniki rozprawy przedstawiono na 42 stronach, a sposób ich prezentacji nie budzi moich zastrzeżeń. Zostały one odpowiednio zilustrowane, a gdy było to konieczne, wsparto je analizami statystycznymi. Zwrócę jedynie uwagę na dość słabą jakość zdjęć dołączonych do ryciny 21, ilustrujących testowanie *in vitro* zdolności bakterii do tworzenia biofilmu.

Dyskusja rozprawy została przeprowadzona na tle bogatego zestawu literatury. Warte podkreślenia jest, że w całej rozprawie zacytowano łącznie ponad 300 prac, obejmujących również najnowsze pozycje z zakresu poruszanej tematyki.

## Ocena merytoryczna wyników rozprawy

Zasadniczym celem ocenianej rozprawy była identyfikacja i charakterystyka genów indukowanych w wysokich i niskich temperaturach w komórkach bakterii *Dickeya solani* i *Pectobacterium artrosepticum*. Zaobserwowane wcześniej fluktuacje występowania obu gatunków bakterii, skorelowane ze zmianami średniej temperatury w poszczególnych

latach, zachęcały do przeprowadzenia tego typu analiz i poszukiwania odpowiedzi na pytanie, na ile zmiany te wpływają na ekspresję genów zaangażowanych w proces patogenezę.

W badaniach zastosowano klasyczne podejście mutagenyzy transpozonowej, wykorzystując jako narzędzie transpozon pochodny Tn5, zawierający bezpromotorowy gen reporterowy  $\beta$ -glukuronidazy. W pierwszym etapie prac zgromadzono łącznie ponad 13,5 tysiąca mutantów transpozonowych, a następnie poszukiwano wśród nich takich, w których gen reporterowy znajdował się pod kontrolą indukowanego temperaturą promotora. To na pozór proste zadanie, oparte na analizie porównawczej aktywności enzymatycznej  $\beta$ -glukuronidazy, nie było łatwe i wymagało opracowania i zastosowania kilkietapowej procedury selekcji temperaturowrażliwych fenotypów. Doprowadziło to do identyfikacji w obu szczepach łącznie 86 mutantów, które poddano dalszym szczegółowym analizom.

W pierwszej kolejności zmapowano miejsca insercji transpozonu w genomach mutantów, a tym samym zidentyfikowano zmutowane geny, którym, na podstawie analiz porównawczych, przypisano potencjalne funkcje. Następnie zbadano fenotypy zmutowanych szczepów, poszukując znaczących różnic w porównaniu ze szczepami typu dzikiego. Badano m.in. ruchliwość bakterii, produkcję auksyn i sideroforów, aktywność celulaz, fosfolipaz i enzymów pektynolitycznych, efektywność wytwarzania biofilmu oraz zdolność do maceracji bulw ziemniaka i liści cykorii w warunkach laboratoryjnych. Analizy te pozwoliły na wskazanie mutacji, które objawiały się m.in. zmniejszoną zdolnością do tworzenia biofilmu i maceracji tkanek roślinnych. Zidentyfikowano tym samym geny, których aktywność może mieć potencjalne znaczenie podczas infekowania roślin i wywoływania objawów chorobowych. Obserwacje te wymagają jednak weryfikacji m.in. poprzez konstrukcję mutantów typu *knockout* i analizę komplementacyjną, co zauważyła również sama Autorka, podkreślając w pracy konieczność przeprowadzenia tego typu eksperymentów.

W Dyskusji rozprawy dominują dwa główne wątki. Pierwszy przynosi rozważania na temat częstości identyfikacji temperaturowrażliwych *loci* oraz wpływu doboru temperatur i warunków wzrostu bakterii na liczbę zidentyfikowanych mutantów, natomiast drugi koncentruje się na analizie fenotypów uzyskanych szczepów oraz biologicznej roli zinaaktywowanych genów. Rozdział ten stanowi ważne dopełnienie rozprawy i przynosi odpowiedzi na niektóre pytania nasuwające się podczas lektury Wyników. Inne pytania i komentarze zamieszczam niżej.

(1) Wykorzystanie transpozonu mini-Tn5gusA w mutagenyzy transpozonowej uzasadniane jest w pracy jedynie obecnością odpowiedniej kasety selekcyjnej. Należałoby również podkreślić inne ważne walory tego transpozonu, wynikające z właściwości jego maszynery transpozycyjnej, które predestynują go do tego typu analiz. Uważam, że informacje te powinny znaleźć się w pracy, w której mutagenyza transpozonowa odgrywa tak ważną rolę.

(2) Plazmid wykorzystany w mutagenie transpozonowej nie zawiera markera pozwalającego na przeprowadzenie kontrselekcji, a tym samym eliminację transkoniugantów, w których doszło do wbudowania całego plazmidu samobójczego do genomu biorcy. Przeprowadzona w pracy detekcja transpozonu w genomach mutantów metodą PCR nie pozwala na identyfikację takich zdarzeń. Być może nie są one zbyt częste, należy jednak być ich świadomym, zwłaszcza przy określaniu częstości transpozycji transpozonu.

(3) W Dyskusji rozprawy wyliczono prawdopodobieństwo mutacji wszystkich genów, które można zmutować w analizowanych szczepach. Wykorzystano do tego wzór wymagający podania liczby genów niezbędnych (ang. *essential genes*). W jaki sposób zidentyfikowano takie geny w obu szczepach?

(4) Ważnym etapem badań była identyfikacja miejsc insercji transpozonu w uzyskanych mutantach. Jak czytamy w pracy, cel ten osiągnięto poprzez: wyizolowanie całkowitego DNA z poszczególnych zmutowanych szczepów oraz odczytanie, na tej matrycy, sekwencji nukleotydowych flankujących transpozon, wykorzystując do tego celu dwa wyszczególnione startery. Poprosiłbym o przedstawienie bardziej szczegółowych informacji na temat całej procedury oraz zastosowanej strategii sekwencjonowania DNA, o której nie ma wzmianki w rozdziale Metody.

(5) W pracy przedstawiono listę genów zinaktywowanych w wyniku mutageny transpozonowej oraz ich dystrybucję w genomach analizowanych szczepów. Nie znalazłem jednak informacji, czy zwrócono uwagę na lokalizację transpozonu w obrębie poszczególnych genów. Ciekaw jestem opinii Doktorantki, czy dane te mogłyby mieć znaczenie przy interpretacji wyników uzyskanych podczas badania fenotypów zmutowanych szczepów?

(6) Analogiczna uwaga dotyczy braku informacji na temat kontekstu genetycznego, w jakim zmutowane geny występują w chromosomach. Ich usytuowanie w obrębie potencjalnych operonów i możliwość polarnego charakteru niektórych mutacji z pewnością warte są dyskusji. Szczegółowe dane na ten temat mogą jednak przynieść dopiero wyniki analiz transkryptomicznych.

Przedstawione wyżej uwagi nie umniejszają wartości ocenianej rozprawy, lecz stanowią głównie zachętę do głębszej dyskusji. Należy podkreślić, że Doktorantka w pełni zrealizowała postawione cele badawcze i naukowe, wykonując przy tym ogrom prac związanych z identyfikacją i analizą tak dużej puli mutantów. Badania te wymagały optymalizacji niektórych procedur oraz przeprowadzenia licznych testów biochemicznych i mikrobiologicznych, co świadczy o dobrym warsztacie badawczym Doktorantki.

Wstępnie scharakteryzowane w tej pracy geny stanowią doskonały materiał do dalszych badań. W analizowanej puli znajdują się również geny o nieznanym działaniu, których analiza może doprowadzić do identyfikacji nowych *loci* i mechanizmów odgrywających istotną rolę w adaptacji bakterii do zmiennych warunków środowiska i/lub w procesie patogenezy.

## Wnioski końcowe

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi ogólnej wiedzy Doktorantki w zakresie prowadzonej tematyki badawczej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia przez nią badań naukowych. Należy również podkreślić dużą wartość naukową tych badań, które wnoszą wiele nowych informacji do ogólnej wiedzy na temat termoregulacji ekspresji genów bakterii patogennych.

W mojej ocenie rozprawa ta spełnia warunki stawiane pracownikom doktorskim określonym w ustawie o stopniach i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), a dorobek naukowy Kandydatki uzasadnia nadanie Jej stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kaczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

