



SPOŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

Łódź, 21. 08. 2015

Prof. dr hab. Adam Jaworski

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie

Prof. zw. Społecznej Akademii Nauk w Łodzi

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

tel: 42-664-6666

tel. komórkowy: 607-356-577

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl

***Ocena pracy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Golanowskiej
pt. "Characterization of Dickeya solani strains and identification of bacterial and plant
signal involved in the induction of virulence".***

Praca doktorska mgr Małgorzaty Golanowskiej została zrealizowana w laboratoriach Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz *Laboratory of Microbiology Adaptation and Pathogenesis, CNRS, University of Lyon, France* pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej jako promotora oraz Dr. Nicole Hugouvieux-Cotte-Pattat jako kopromotora. Z informacji zawartej na pierwszych stronach pracy doktorskiej wynika, że temat i cele tej pracy doktorskiej znalazły uznanie recenzentów i decydentów w postaci przyznania grantów Narodowego Centrum Nauki, środków z Uniwersytetu Gdańskiego, a także stypendiów otrzymanych ze źródeł zagranicznych (*The French Ministry of Foreign Affairs* oraz *Scholarships for PhD Students in the frame of the European Social Found*).

Praca doktorska mgr Małgorzaty Golanowskiej ma postać zwartej monografii (263 stron) napisanej w języku angielskim, w układzie typowym dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych, obejmuje bowiem *Introduction, Materials, Methods, Results, Discussion, Conclusions, Bibliography*. Rozdziały te poprzedzone są 2-stronicowymi *Streszczeniami* w języku angielskim, francuskim i polskim. Sześć jednoznacznie sformułowanych wniosków końcowych (*Conclusions*) zamyka tą bardzo dobrze opracowaną pod względem formalnym monografię doktorską.

Pewien niedosyt recenzenta jest związany z brakiem, zarówno w monografii doktorskiej, jak i w przesłanych mi innych materiałach, jednoznacznej informacji na temat życiorysu naukowego Doktorantki, w szczególności zaś danych o Jej dotychczasowym dorobku publikacyjnym i innej aktywności naukowej. Takie informacje są dla recenzenta bardzo istotne w ocenie nie tylko wartości naukowej recenzowanej pracy, ale także osobistego wkładu Doktorantów w dokonania naukowe dużych, silnych zespołów naukowych, a do takich zaliczam zespół prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej. Dopiero uważna analiza całej pracy doktorskiej i cytowanej w niej literatury, w tym licznych prac zespołu prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej, pozwoliły mi „odkryć”, że mgr Małgorzata Golanowska

jest odpowiednio drugim i trzecim współautorem w trzech zespołowych pracach doświadczalnych, opublikowanych w latach 2014-2015 w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR. Co więcej, tematyka tych prac w części jest związana z tematem i celami Jej pracy doktorskiej. Po analizie treści naukowych zawartych w tych trzech pracach mogę stwierdzić, że wyniki opublikowane w monografii doktorskiej zostały w części już upowszechnione w międzynarodowym obiegu naukowym, co w moim rozumieniu bardzo umacnia wartość monografii doktorskiej i potwierdza znaczący wkład Doktorantki w przygotowanie wspomnianych wyżej publikacji.

Temat pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Golanowskiej „*Characterization of Dickeya solani strains and identification of bacterial and plant signals involved in the induction of virulence*” mieści się w głównym kierunku znanych mi, bardzo owocnych badań poznawczych i aplikacyjnych zespołu naukowego prof. dr Ewy Łojkowskiej, które od lat są skoncentrowane na dwóch rodzajach patogennych dla roślin bakterii pektynolitycznych, to jest *Pectobacterium* (dawniej *Erwinia carotovora*) i *Dickeya* (dawniej *Erwinia chrysanthemi*). Obiektem badań w pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Golanowskiej stały się patogenne szczepy *Dickeya solani*, gatunku ustanowionego w 2014 roku, które zgodnie z doniesieniami z wielu krajów europejskich, mają zdolność infekowania roślin ziemniaka w strefie klimatu umiarkowanego. Jak pisze Doktorantka, szczepy tego gatunku są także bardziej agresywne, bowiem nawet niski poziom inokulum bakterii może wywołać silne objawy chorobowe roślin ziemniaka.

Jednoznacznie sformułowane trzy cele tej pracy doktorskiej, przedstawione na stronie 46 monografii, obejmowały:

-Przeprowadzenie bardzo szeroko zakrojonej zarówno fenotypowej jak i genotypowej charakterystyki kolekcji szczepów *Dickeya solani* wyizolowanych w latach 2005-2010 w Polsce, Finlandii i w Izraelu, w porównaniu do innych badanych przez Doktorantkę gatunków z rodzaju *Dickeya* (*D. dadandi* i *D. dianthicola*).

-Poszukiwanie w ekstraktach z bulw ziemniaka ewentualnych induktorów regulujących ekspresję wybranych genów *Dickeya solani*, odgrywających ważną rolę w rozwoju infekcji.

-Opisanie pangenomu *Dickeya solani* - w oparciu o dostępne w bazie GenBank sekwencje nukleotydowe genomów sześciu szczepów oraz czterech szczepów zsekwencjonowanych w ramach zrealizowanej pracy doktorskiej, w tym dwóch szczepów wyizolowanych w Polsce oraz dwóch, mniej wirulentnych, wyizolowanych z rizosfery w Niemczech.

Pragnę w tym miejscu pokreślić, że komentowane trzy kierunkowe cele oraz postawione w ramach każdego z nich ważne pytania o charakterze poznawczym, są na miarę poważnego wyzwania naukowego, w którego realizację Doktorantka „wprzęgnęła” bardzo bogaty, nowoczesny warsztat badawczy. Jako doświadczony recenzent bardzo wielu prac doktorskich mogę także powiedzieć, że dwa pierwsze zadania badawcze byłyby wystarczające ambitne dla jednej pracy doktorskiej, a trzecie zadanie, to jest opisanie pangenomu 10 różnych szczepów *Dickeya solani*, mogłoby z powodzeniem stanowić samodzielny cel drugiej pracy doktorskiej.

Treści zawarte w części teoretycznej monografii doktorskiej (*Introduction*), zostały opracowane przez Doktorantkę w oparciu o obficie cytowane, najnowsze pozycje światowej literatury przedmiotu, w tym liczne prace zespołu prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej, z umiejętnym podporządkowaniem kolejnych rozdziałów i podrozdziałów tematowi pracy i sformułowanym celom pracy. Treści trzech, bardzo dobrze opracowanych, najważniejszych rozdziałów *Wstępu* dotyczą, odpowiednio, czynników chorobotwórczości bakterii z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*, złożonym

mechanizmom i czynnikom ich regulacji oraz systemom sekrecji. W kolejnym rozdziale *Wstępu* Doktorantka opisała fenotypowe i genetyczne metody identyfikacji oraz różnicowanie bakterii z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Zaś treści ostatniego rozdziału, zatytułowanego „*Importance of the research on Dickeya spp.*” stanowią silne uzasadnienie badań poznawczych patogennych bakterii z rodzaju *Dickeya*, w tym ostatnio zidentyfikowanego gatunku *Dickeya solani*. Skoro ziemniaki stanowią na świecie jeden z dziesięciu najważniejszych towarów roślinnych (ang. *commodities*), a rosnące straty w uprawach z powodu infekcji bakteriami z rodzaju *Dickeya ssp.* w ostatnich latach w krajach europejskich i w Izraelu osiągają już 25 %, to istotnie istnieje uzasadniona, pilna potrzeba wyjaśnienia tego zjawiska. Stąd, Doktorantka pisze w zakończeniu tego rozdziału, że przyczyną tych infekcji mogą być właśnie szczepy *Dickeya solani*, dobrze zaadaptowane do dużych zmian klimatycznych na kontynencie europejskim.

Obszerne metodyczne rozdziały (*Materials, Methods*) zajmują 23 stron monografii, na których mgr Małgorzata Golanowska bardzo skrupulatnie opisała wszystkie szczepy bakterii, plazmidy, fagi, odczynniki i reagenty oraz zastosowane metody i techniki mikrobiologiczne, enzymatyczne, molekularne i genetyczne. Zwraca uwagę bogactwo zastosowanych metod dla oznaczania aktywności enzymatycznej badanych szczepów oraz skonstruowanych mutantów, technik inżynierii genetycznej dla konstrukcji dobrze zaplanowanych mutantów, metod molekularnych użytych dla genotypowania szczepów, a także metod i programów bioinformatycznych niezbędnych dla przeprowadzenia analizy porównawczej struktury genomów (*comparative genomics*) dziesięciu szczepów *Dickeya solani*, ich stabilności genetycznej i powiązań filogenetycznych.

Mogę w tym miejscu stwierdzić, że zastosowane w pracy nowoczesne metody i techniki zostały prawidłowo dobrane do określonych analiz oraz skali ich złożoności, a stąd uzyskane wyniki należy uznać za w pełni wiarygodne. Ponadto, skrupulatność Doktorantki w opisie wszystkich użytych materiałów, zastosowanych metod, technik, procedur i aparatury oceniam jako zaletę, bowiem czytelnikom tej monografii umożliwi powtórzenie lub odtworzenie opisanych w niej wyników i pozwoli na ewentualną weryfikację sformułowanych wniosków końcowych.

Bardzo starannie opracowany rozdział Wyniki (*Results*), wraz z Dyskusją (*Discussion*) oraz Wnioskami końcowymi (*Conclusions*), obejmuje 75 stron monografii doktorskiej. Doktorantka, krok po kroku, opisała wszystkie uzyskane wyniki w czasie realizacji trzech kolejnych celów badawczych, ilustrując je w postaci 24 czytelnych tabel i 48 dobrze skonstruowanych kolorowych rysunków i wykresów. W *Dyskusji* uzyskane rezultaty poddała, z dużym znanstwem, krytycznej analizie na tle danych literatury światowej. Uzyskane wyniki na kolejnych etapach badań enzymatycznych, molekularnych i genetycznych oraz postawione ostrożne wnioski cząstkowe - stały się mocną podstawą do sformułowania sześciu bardziej ogólnych, w moim przekonaniu, w pełni uprawnionych wniosków końcowych.

Jako recenzent monografii doktorskiej mgr Małgorzaty Golanowskiej mam bardzo ułatwione zadanie, bowiem część wyników opisanych w przedstawionej mi monografii została upowszechniona w międzynarodowym obiegu naukowym w postaci 2 zespołowych prac doświadczalnych opublikowanych w latach 2014-2015 w czasopiśmie z listy JCR (*Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014; *Plant Diseases*, 2015), których Małgorzata Golanowska jest drugim współautorem, co świadczy o Jej istotnym wkładzie w przygotowanie tych spójnych tematycznie i bardzo wartościowych prac doświadczalnych. Stąd, jako recenzent nie mam nic specjalnie odkrywczego do dodania na temat samego projektu badawczego i wartości wyników opisanych w ocenianej

monografii doktorskiej. Pierwszymi recenzentami zarówno monografii doktorskiej jak i opublikowanych prac - byli przecież uznani specjaliści w tej dziedzinie wiedzy, jakimi są promotorzy ocenianej pracy doktorskiej, a równocześnie współautorzy wyżej wymienionych publikacji, prof. dr hab. Ewa Łojkowska i Dr. Nicole Hugouvieux-Cotte-Tattat. Co więcej, wartość naukowa projektu została doceniona przez edytorów i wymagających recenzentów wyżej cytowanych, specjalistycznych czasopism naukowych, w których część uzyskanych wyników została opublikowana. Ponadto, z informacji udzielonych mi drogą internetową przez mgr Małgorzata Golanowska wiem, że obecnie są przygotowywane do druku dwie kolejne prace doświadczalne, w których będzie pierwszym autorem.

Chciałbym zatem skomentować jedynie niektóre opisane w monografii doktorskiej rezultaty, które w moim rozumieniu są interesujące z racji poznawczych, bowiem wnoszą nową wiedzę na temat fenotypowej i genetycznej różnorodności nowego, patogenego gatunku *Dickeya solani* i jego zdolności adaptacyjnych, w tym do temperatury wzrostu i rozwoju. W świetle opisanych wyników nie ulega wątpliwości, że szczepy gatunku *Dickeya solani* odznaczają się znacznie większą produkcją enzymów odpowiedzialnych za degradację ściany komórkowej roślin (PCWDE) niż szczepy pokrewnego gatunku *Dickeya dianthicola*. Okazało się także, że szczepy *Dickeya solani* wyizolowane w Polsce są bardziej wirulentne oraz syntetyzują w trzech testowanych temperaturach (18, 28 i 37 °C) znacznie więcej enzymów pektynolitycznych, celulolitycznych i proteolitycznych niż szczepy pochodzące z Finlandii i Izraela. Ciekawe, te istotne różnice w produkcji tak wielu białek enzymatycznych, czynników chorobotwórczości, nie mają praktycznie żadnego odzwierciedlenia w zróżnicowaniu genetycznym badanej kolekcji tego gatunku. Wyniki głębokiego genotypowania tych szczepów oraz sekwencjonowania całych genomów ujawniły ich genetyczną „homogenność”. Co więcej, przeprowadzona bioinformatyczna analiza sekwencji 9 białek enzymatycznych grupy PCWDE oraz 19 białek, regulatorów ekspresji genów wirulencji dla 10 zsekwncjonowanych szczepów *Dickeya solani* - ujawniła wśród nich 100 % homologii.

Zachodzi więc ważne pytanie, jakie, dotąd nieznanne, czynniki środowiskowe lub/i endogenne mogą kształtować tak zróżnicowane fenotypy w standardowych, laboratoryjnych warunkach na „wzorcu” identycznego genotypu? Proszę mgr Małgorzatę Golanowską o przedstawienie swojego poglądu, roboczej hipotezy na ten temat w czasie obrony pracy doktorskiej.

Za ważny uznaję wynik wskazujący, że bliżej nieokreślony składnik/związek ekstraktu ziemniaka silnie indukuje w układach skonstruowanych, modelowych szczepów ekspresję genów *pell* oraz *lfaA*, kodujących syntezę, odpowiednio, białka pektynazy L i białka systemu regulatorowego LacI. Nie udało się jednak tego związku, jak dotąd, zidentyfikować.

W Dyskusji Doktoranta zapowiada, że identyfikacja tego związku będzie przedmiotem dalszych badań. Chciałbym więc zapytać jakich technik, metod zamierza użyć, by uzyskać odpowiedź na to istotne pytanie?

W oparciu o własne wyniki bioinformatycznej analizy pangenu *Dickeya solani* oraz nieliczne jeszcze, aktualne dane literatury światowej, dotyczące specyficznego dla *Dickeya solani* regionu genomu, kodującego nierybosomalną peptydową syntetazę NRPS, poliketydową syntetazę PKS oraz systemy sekrecyjne typu V i VI (T5SS i T6SS) - Doktoranta sformułowała jeden z bardzo ważnych wniosków końcowych:

*„Core genome *D. solani* comprises genes encoding major virulence factors (PCWDE) and their regulators and also genes coding NRSP/PKS and T6SS efektors”.*

W tym kontekście z dużym zainteresowaniem przestudiowałem rozdział 3.4 monografii „*Secretion system and their role in SRE cells*”, a także cytowaną w *Dyskusji* pracę Pedron i wsp. opublikowaną w 2014 roku w czasopiśmie *BMC Genomics*. Już sam tytuł tej pracy był dla mnie intrygujący: „*Genomic and metabolic comparison with Dickeya dadandi 3937 reveals the emerging Dickeya solani potato pathogen to display distinctive metabolic activities and T5SS/T6SS - related toxin repertoire*”.

Wiadomo, że system toksyna-antytoksyna jest szeroko rozpowszechniony w świecie bakterii chorobotwórczych i spełnia niezwykle ważną rolę w regulacji toksyn, czynników chorobotwórczości, w odpowiedzi na zmiany warunków i czynników środowiskowych.

Proszę jednak Doktorantkę o wyjaśnienie, czy w świetle wyników opisanych w pracy Pedron i wsp., można uznać, że szczepy Dickeya solani kodują specyficzne, odmienne systemy sekrecyjne typu V i VI zwane, jak napisała w Dyskusji, „distinctive arsenal of T5SS and T6SS related toxin-antitoxin systems.

Zgadzam się z opinią wyrażoną przez mgr Małgorzatę Golanowską w świetnie napisanej *Dyskusji*, że geny kodujące enzymy NRSP i PKS oraz systemy sekrecyjne T5SS i T6SS *D. solani* mogą istotnie spełniać ważną, specyficzną rolę biologiczną: „*These genes may contribute to bacteria-bacteria interaction and to the fitness of D. solani, its advantages in different ecological niches and its ability to cause disease symptoms*”.

Po uważnym przestudiowaniu całej, bardzo wartościowej monografii doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Golanowskiej, w tym uzyskanych wyników o charakterze poznawczym, uważam, że nakreślone w monografii kierunki dalszych badań groźnych patogennych szczepów bakterii *Dickeya solani* przyniosą wyniki na miarę kolejnych wartościowych publikacji.

Wnioski końcowe

Uważna analiza całej monografii doktorskiej upoważnia mnie do stwierdzenia, że Pani mgr Małgorzata Golanowska podjęła w swojej pracy bardzo aktualny, ważny temat o charakterze poznawczym. Sformułowane cele pracy należy uznać za poważne wyzwanie naukowe. Wyniki, uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych „narzędzi” biochemicznych molekularnych, genetycznych i bioinformatycznych uznaję za w pełni wiarygodne i bardzo wartościowe. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani Małgorzaty Golanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o stosowne wyróżnienie tej ambitnej, bardzo dobrze zaplanowanej pracy i utalentowanej Doktorantki z dwóch powodów. Po pierwsze, tematykę badawczą uznaję za ważną, a uzyskane rezultaty w znacznej części za oryginalne osiągnięcie naukowe. Po drugie, część wyników zostało upowszechnionych w latach 2014-2015 w międzynarodowym obiegu naukowym w postaci dwóch zespołowych prac doświadczalnych z listy JCR, w tym pracy przyjętej do druku w 2015 roku w czasopiśmie *Plant Diseases*, w której mgr Małgorzata Golanowska ma bardzo znaczący udział na wszystkich etapach jej realizacji. Wiem także, że obecnie są przygotowywane kolejne 2 prace doświadczalne, w których będzie pierwszym autorem.