

Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Pałasz  
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii  
Uniwersytet Gdański  
ul. Wita Stwosza 59  
80-308 Gdańsk  
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl  
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 20.09.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Pani magister Katarzyny Giermasińskiej-Buczek**  
**„Wybrane interakcje bakteriofaga P1 z *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens* w kontekście możliwości wykorzystania P1 jako narzędzia genetycznego w badaniach tych bakterii”**

Klasyczna mikrobiologia i genetyka opiera się na odkryciach sprzed kilkudziesięciu lat, a modele wówczas opisane są nadal aktualne i sprawdzają się w pracy laboratoryjnej, co więcej, ciągle stanowią nowe wyzwania i stawiają przed badaczami nowe pytania. Takim klasycznym modelem jest bakteriofag P1, łagodny wirus bakteryjny, wyizolowany z *Escherichia coli* w 1951 roku. Od tamtego czasu wiele aspektów budowy, funkcji i genetyki tego faga zostało poznanych, stał się on jednym z kluczowych modeli fagowych w biologii molekularnej dla wielu procesów, jak replikacja DNA, partycja, wiedza o systemach toksyna-antytoksyna. Co więcej, jego zdolność do uogólnionej transdukcji jest do tej pory wykorzystywana w konstrukcji szczepów bakteryjnych. Z uwagi na to, że jest to fag o szerokim zakresie gospodarzy, w odróżnieniu od drugiego sztandarowego modelowego faga  $\lambda$ , zainteresowania badaczy skierowały się na możliwości międzygatunkowego przenoszenia informacji genetycznej. Jest to szczególnie istotne dla tych bakterii, u których narzędzia manipulacji genetycznej są ograniczone, a jednocześnie bakterie te są ważne z przyczyn naukowych i aplikacyjnych. W nurt tych badań wpisuje się idealnie rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek, podejmując problematykę zastosowania faga P1 jako narzędzia w pracy w bakteriami środowiskowymi. Pani mgr Giermasińska-Buczek wykonywała swoją pracę doktorską w Katedrze Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej

Gospodarstwa Wiejskiego oraz Pracowni Biologii Bakteriofagów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod opieką promotora, Pani profesor dr hab. Małgorzaty Łobockiej. Zespół Pani promotor od lat zajmuje się zagadnieniami związanymi z biologią bakteriofagów, a Pani Profesor jest światowej sławy specjalistką w dziedzinie genetyki i biologii bakteriofaga P1. Dlatego też Doktorantka mogła skorzystać z szerokiego doświadczenia naukowego Pani Promotor, co miało przełożenie na wysoką jakość rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa ma postać klasycznej monografii, 205 stronicowej, napisanej w języku polskim wraz ze streszczeniami w języku polskim i angielskim. Praca ma układ typowy dla opracowań opartych na badaniach eksperymentalnych, i jest podzielona na odpowiednie sekcje, poprzedzone spisem treści i skrótów stosowanych w rozprawie. Pierwszy, 32 stronicowy rozdział to wstęp, bardzo dobrze przybliżający historię odkrycia P1, jego genetykę i zastosowania w biologii molekularnej. Wstęp zawiera także informacje o bakteriach będących przedmiotem badań, *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens*. Informacje podane są jasno i przejrzysto, a uzupełniają je ryciny i tabela, cytowane są także odpowiednie źródła literaturowe. Cel pracy jest logicznym następstwem przedstawionych informacji, został on przedstawiony jasno, a dodatkowo zostały sprecyzowane cele szczegółowe. Kolejne rozdziały, Materiały i Metody, przedstawiają stronę techniczną i metodologiczną rozprawy, a więc zestawienie szczepów, wektorów, bakteriofagów oraz oligonukleotydów stosowanych w pracy, a także, co jest pomocne w późniejszej lekturze pracy, spis plazmidów i bakteriofagów powstałych podczas realizacji rozprawy wraz z opisem ich skonstruowania. Opisanie zostały także odczynniki używane w pracy wraz z danymi o ich producentach. Rozdział Metody opisuje dokładnie metodologię stosowaną w pracy, a więc warunki hodowli bakterii, namnażania bakteriofagów, techniki klonowania i transformacji, warunki reakcji PCR. Załączony schemat konstrukcji przykładowego plazmidu stosowanego w pracy ułatwia późniejsze podążanie za tokiem doświadczeń przedstawionych w rozprawie. Najobszerniejszy 62-stronicowy rozdział to Wyniki. Prezentuje on w kolejne etapy prowadzące do osiągnięcia przedstawionych wcześniej celów szczegółowych pracy. Podział na podrozdziały, z których większość jest poprzedzona krótkim wprowadzeniem i zakończona krótkim podsumowaniem, co ułatwia zapoznanie się z kompletem rezultatów badań. W tym rozdziale zwraca uwagę staranne i szczegółowe przedstawienie kolejnych doświadczeń wraz z fotografiami żeli i łysek fagowych, wykresami i rycinami. Obecne są także tabele zestawiające informacje o genach i białkach fagowych i plazmidowych. W opisie Wyników zwraca uwagę szczegółowy opis doświadczeń i wyjaśnienia, dlaczego zostały podjęte określone badania. Widać w tym rozdziale

bardzo dobre przygotowanie Doktorantki do pracy a także konsekwentne podążanie za linią badawczą. W rozdziale Dyskusja zaprezentowane jest podsumowanie wyników badań wraz z ich interpretacją na tle wyników badań znanych z literatury światowej (prawidłowo i dogłębnie cytowanej). Szczególnie cenne są wyjaśnienia niepowodzeń w konstrukcji mutantów i stawianie odpowiednich hipotez, co świadczy o dobrym przemyśleniu wyników przez Doktorantkę. W rozprawie zawarto podsumowanie najważniejszych osiągnięć pracy. Rozprawa zakończona jest materiałami uzupełniającymi do poszczególnych podrozdziałów. Praca została napisana poprawnym językiem naukowym, czyta się ją dobrze. Jednakże z obowiązku recenzenta chciałam zauważyć obecność dość licznych błędów literowych, nietypowych określeń, jak również niepoprawnie odmienionych słów (np. dopełniacz od słowa podłoża to podłoży, a nie podłóż). W Tabeli 2 (Materiały) brakuje określenia, jaki gatunek bakterii jest opisany (w przypadku kilku wpisów). Prawidłowa nazwa *Dickeya* to *dadantii*, a nie *dedantii* (jak powtarza się w kilku miejscach pracy). Ponadto (str. 88, drugie zdanie), faga P1 nie można raczej określić jako donora DNA chromosomalnego, donorem jest bakteria, na której fag się namnaża. Błędy te nie umniejszają oczywiście całościowego, bardzo ciekawego przekazu rozprawy.

Jako główny cel w swojej rozprawie, Pani Katarzyna Giermasińska-Buczek zaplanowała zbadanie możliwości wykorzystania bakteriofaga P1 jako podstawy dla narzędzi do manipulacji genetycznych u dwóch gatunków bakterii środowiskowych, *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterie te budzą zainteresowanie naukowców z różnych względów: *A. tumefaciens* jest patogenem roślin o szerokim zakresie gospodarzy. Jest ona nie tylko modelem badawczym ale także źródłem plazmidu pTi wykorzystywanym w inżynierii genetycznej. *P. agglomerans* natomiast jest bakterią o dużej plastyczności metabolicznej i środowiskowej, może ona także służyć do biokontroli działając antagonistycznie do różnych patogenów. Z uwagi na ciekawe właściwości tych gatunków bakterii i znaczenie dla nauki, oraz niewystarczająco rozwinięte narzędzia inżynierii genetycznej, uzasadniony jest wybór tych dwóch przedstawicieli do badań w doktoracie. Ponadto, szczegółowe cele pracy zakładały także charakterystykę rejonów faga P1 możliwych do wykorzystania dla klonowania heterologicznego DNA oraz zbadania roli systemów partycji i addykcji w utrzymywaniu plazmidowych profagów P1. Chciałam tu bardzo docenić podjęcie tematyki w zakresie klasycznej genetyki – jest to bardzo cenne i pokazuje, jak nadal klasyczne modele badawcze mogą znajdować współcześnie zastosowanie. W toku swojej pracy Doktorantka podjęła się skonstruowania szeregu mutantów fagowych i bakteryjnych w celu osiągnięcia założeń pracy. W pierwszym etapie powstały mutanty P1 z inaktywowaną kasetą

*parAB* oraz usuniętym systemem toksyna-antytoksyna Phd/Doc, uważanym za istotny w zjawisku addykcji. Co ciekawe, dalsze badania wykazały, iż o ile efektywnie działający system partycji jest niezbędny dla utrzymania profaga P1, to brak systemu addykcji zaskakująco nie powodował znaczącego obniżenia retencji profagów w komórce. Na tyle, że możliwe było nawet zastąpienie rejonu *phddoc* innym DNA. Należy podkreślić wartość uzyskanych danych opisujących podstawy mechanizmów stabilnego utrzymywania się plazmidów P1 w komórce gospodarza. Niezależnie od możliwości użycia kasety *phddoc* jako miejsca do wstawienia obcego DNA, Doktorantka określiła jeszcze dwie opcje – sekwencję IS1 i gen *pdcb*. Inaktywowanie tych sekwencji nie zakłócało stabilności profaga P1 w lizogenach. Przy okazji Doktorantka odkryła mutację punktową w promotorze genu *lpa* (aktywatora późnych genów fagowych) zaburzającą rozwój lityczny bakteriofaga. W późniejszych badaniach korzystała już z skonstruowanego przez nią szczepu pozbawionego genu *pdcb* jednakże z dziką wersją genu *lpa*. Wykrycie mutacji obecnej w genie *lpa* i kolejne obserwacje świadczą o dociekliwości i wnikliwości Doktorantki, są to cechy bardzo cenione w pracy naukowej. Kolejne doświadczenia wykazały, że gen *pdcb* nie jest niezbędny fagowi do rozwoju ani utrzymywania profaga, w związku z czym może być dogodnym miejscem wstawiania genów do transferu przez P1. Jednakże, aby w ogóle przeniesienie genów i ewentualna rekombinacja z organizmem biorcy mogła zajść, P1 musi być zdolny do infekcji danego gatunku bakterii, a w przypadku docelowego przeniesienia genów przez postać profaga, musi być również zdolny do lizogenizacji gospodarza. Wykazano w pracy, iż P1 może nie tylko infekować *P. agglomerans*, ale także przenosić do niej heterologiczną DNA. Jednakże, niepowodzeniem zakończyły się próby lizogenizacji tej bakterii przez P1. Doktorantka podjęła się znalezienia przyczyny tej sytuacji, i w tym celu zsekwencjonowała pełen genom *P. agglomerans* L15, uzyskując interesujące dane o obecności, poza głównym chromosomem, także 3 plazmidów. Zostały one przeanalizowane pod kątem zawartości informacji genetycznej i modelu replikacji oraz utrzymywania się w komórce, a sekwencje zostały zdeponowane w bazie danych. Ta część pracy wnosi bardzo ciekawe informacje o samej bakterii i jest cennym wkładem w poznanie genetyki *P. agglomerans*. Podejmowane próby usunięcia plazmidów z komórki zakończyły się częściowym sukcesem, jako że jeden z trzech plazmidów nie poddał się usunięciu. Obecność tego plazmidu uniemożliwiła lizogenizację fagiem P1, a ewentualne przyczyny tej sytuacji zostały interesująco przedyskutowane. Ciekawe wyniki uzyskano z doświadczeń z przenoszeniem plazmidów z *E. coli* do *P. agglomerans*, gdzie P1 posłużył za wygodny, aczkolwiek działający z małą wydajnością, wektor. Jest to podstawa do dalszych badań i ulepszeń systemu. Dla *A. tumefaciens* powodzeniem zakończyły się próby przeniesienia

plazmidu z *E. coli* za pomocą faga P7, podobnego genetycznie i funkcjonalnie do P1. Co także wskazuje na przyszłe możliwości transdukcji tej bakterii. Zwraca jednakże uwagę bardzo niewielką liczbą doświadczeń przeprowadzonych na tej bakterii. Z tytułu rozprawy wynikałoby, że prace będą prowadzone równoległe i równocześnie dla obu modeli bakteryjnych. Dlaczego *A. tumefaciens* poświęcono znacznie mniej pracy i uwagi? W rozprawie zwraca uwagę logiczny ciąg doświadczeń i sprawne wyciąganie wniosków przez Doktorantkę, praca eksperymentalna została poprowadzona i wykonana starannie. Dyskusja wyników wskazuje na dobre zrozumienie tematyki, jak również podkreśla znaczenie uzyskanych danych. Oceniam osiągnięcia przedstawione w pracy za bardzo cenne dla wiedzy o P1 i możliwościach zastosowania tego faga w inżynierii genetycznej nietypowych gospodarzy, bardzo ważne są także wiadomości o samych gospodarzach i ich genetyce.

Podczas obrony, chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź na następujące pytania i komentarze:

- Jakie były podstawy tak znacznej zmiany taksonomii bakteriofagów w ostatnich latach?
- Czy bakteriofag P1 jest w stanie przeprowadzić pełną transdukcję (analogicznie jak u *E. coli*), u patogenu roślin, *Dickeya dadantii*? Czy ta metoda jest wykorzystywana w manipulacjach genetycznych tej bakterii?
- Czy podczas izolacji całkowitego DNA z bakterii będących przedmiotem badań, *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens*, napotkano na trudności techniczne (często spotykane przy izolacji DNA z bakterii środowiskowych z uwagi na ich budowę ściany komórkowej)?
- Jeśli jak wykazano w pracy, geny systemu addykcji w P1 są praktycznie zbędne i można ich pozbyć się bez straty istotnych dla faga czy plazmidu funkcji, jaka jest w takim razie hipotetyczna ich funkcja, skoro są jednak utrzymywane jako element genetyczny faga?
- W roku pracy uzyskano szczepy *P. agglomerans* pozbawione dwóch z trzech obecnych plazmidów. Plazmidy te kodują wiele genów o potencjalnych ważnych funkcjach. Czy takie szczepy charakteryzowały się niższą przeżywalnością albo w jakiś sposób zmniejszoną konkurencyjnością wobec szczepu dzikiego?

- W pracy wykazano możliwość przenoszenia przez P1 plazmidów z *E. coli* do badanych szczepów środowiskowych. Czy istnieje także możliwość przeniesienia fragmentów chromosomu dawcy, jak w klasycznej transdukcji między szczepami *E. coli*?
- Bakterie stosują dla obrony przed bakteriofagami m. in. systemy CRISPR/Cas. Czy z uwagi na wielogospodarzowość P1 ma on mechanizmy zabezpieczające przed różnymi systemami z tej grupy u różnych bakterii?
- U *E. coli* wykazano, że brak aktywnego białka DksA powoduje znacznie wydajniejszy rozwój faga P1 (Cech i wsp., 2021). Czy badane gatunki bakterii mają homologi *dksA* i czy można by wykorzystać obserwację z *E. coli* dla celów lepszego namnażania P1 w *P. agglomerans* i *A. tumefaciens*?

W podsumowaniu, chciałabym stwierdzić, że otrzymana do recenzji praca stanowi zbiór ciekawych wyników o znaczeniu dla mikrobiologii i inżynierii genetycznej. Wnosi ona interesujące wiadomości na temat rozwoju bakteriofaga P1 w komórkach nietypowych bakteryjnych gospodarzy, jak również o genetyce samych gospodarzy. Należy wyrazić nadzieję, iż wyniki tych porządnie przeprowadzonych i dobrze opisanych badań zostaną wkrótce opublikowane w znaczącym czasopiśmie naukowym.

Jako wniosek końcowy, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek stanowi znaczące osiągnięcie naukowe i stanowi istotny wkład w wiedzę na temat biologii i rozwoju faga P1 jak i możliwości jego zastosowania jako narzędzia w manipulacjach genetycznych. Przedstawiona do recenzji rozprawa spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669). W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Szalewska - Peten



UNIWERSYTET GDAŃSKI

WYDZIAŁ BIOLOGII

Katedra Genetyki i Mikrobiologii Bakteri  
ul. Wita Stwosza 59, 80-830 Gdańsk  
T +48 58 523 64 20, F +48 58 523 60 25

**OPŁATA POBRANA**  
**TAXE PERÇUE-POLOGNE**  
Umowa z Poczta Polska S.A.  
ID nr 499908/W



KANCELARIA GŁÓWNA SGGW

2023 -10- 10

WPLYNĘŁO DNIA -2-



552114 2023-10-04 00

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w

Warszawie

Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

2023-10-04



RPW/30587/2023 N

Data: 2023-10-10