



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Genetyki Bakterii
prof. dr hab. Dariusz Bartosik



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek, pt.

„Wybrane interakcje bakteriofaga P1 z *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens* w kontekście możliwości wykorzystania P1 jako narzędzia genetycznego w badaniach tych bakterii”

wykonanej w Katedrze Biochemii i Mikrobiologii Instytutu Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego oraz Pracowni Biologii Bakteriofagów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Łobockiej

Badania mikrobiologiczne często prowadzą do identyfikacji nowych szczepów bakterii o ciekawych, niekiedy unikatowych właściwościach. Chociaż bakterie te znajdują często duże zainteresowanie wśród badaczy, praca z nimi zwykle przysparza wielu problemów. Doskonale zdaje sobie z tego sprawę każdy, kto prowadził badania o charakterze molekularnym z wykorzystaniem naturalnych izolatów środowiskowych bądź izolatów klinicznych bakterii. Problemy te wynikają m.in. z braku odpowiednich narzędzi genetycznych oraz efektywnych procedur eksperymentalnych, które zostały pierwotnie opracowane i zoptymalizowane dla modelowych mikroorganizmów. Ważnym zadaniem badawczym jawi się zatem ocena zakresu możliwości wykorzystania dostępnych narzędzi i metodyki do analiz różnych grup mikroorganizmów.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek wpisuje się w ten nurt tematyczny, stawia bowiem za cel zbadanie możliwości wykorzystania bakteriofaga P1 w konstrukcji narzędzi genetycznych przydatnych w badaniach szczepów dwóch gatunków bakterii – *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens*, reprezentujących różne klasy taksonomiczne, odpowiednio, *Gamma-* i *Alphaproteobacteria*. P1 zasługuje na szczególną uwagę m.in. ze względu na występowanie jego profaga w formie autonomicznej, imitującej plazmid. Jest to również modelowy bakteriofag w badaniach mechanizmu transdukcji ogólnej, a więc zjawiska, które od wielu lat znajduje praktyczne zastosowanie m.in. w konstrukcji zmodyfikowanych genetycznie szczepów bakterii. Wybór tej tematyki badawczej uważam za w pełni zasadny, zarówno ze względów praktycznych, jak i poznawczych, bowiem analiza oddziaływań P1 z komórkami obu szczepów może przynieść nowe informacje na temat biologii tego bakteriofaga oraz czynników determinujących zakres jego gospodarzy.

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek została przygotowana w języku polskim i liczy 205 stron. Jest ona odpowiednio zilustrowana (39 rycin i 19 tabel), a zawarte w niej treści przedstawiono w sposób klarowny i uporządkowany. Rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań, zatem można w niej wyróżnić kolejne części, obejmujące: streszczenie (w języku polski i angielskim), wprowadzenie do tematyki badań, opis zastosowanych materiałów, procedur i technik eksperymentalnych, postawione cele badawcze, opis przeprowadzonych eksperymentów, interpretację i podsumowanie uzyskanych wyników oraz bibliografię. W rozprawie zamieszczono również wykaz stosowanych skrótów, a także materiały uzupełniające, zawierające szczegółowe dane zgromadzone w wyniku przeprowadzonych eksperymentów i analiz. Praca została przygotowana starannie, nie mniej jednak nie jest ona pozbawiona nielicznych błędów literowych, językowych czy edytorskich. Jako przykład podam: (a) pojawiające się w wielu miejscach pracy stwierdzenie, że geny są kodowane (w operonie czy w genomie faga; np. str. 20), podczas gdy to geny kodują..., (b) termin „leczenie z plazmidów” zastąpiłbym sformułowaniem „usuwanie plazmidów z komórki”, (c) „multimery” plazmidowe to w języku polskim „oligomery” tych replikonów, a (d) kolonie bakterii nie rosną na szalkach z antybiotykiem, lecz na podłożu mikrobiologicznym (str. 37).

Ocena poszczególnych części rozprawy

Tytuł rozprawy jest informatywny, jednak, w mojej opinii, jego początek „*Wybrane interakcje bakteriofaga P1 z *Pantoea agglomerans* i *Agrobacterium tumefaciens*....*” wymaga niewielkiej modyfikacji. Należałoby podkreślić, że chodzi tu o interakcje faga z komórkami bakterii. Z punktu widzenia poprawności językowej, tytuł w tym brzmieniu może sugerować również pochodzenie izolatów P1 z ww. gatunków.

Wstępną część pracy, nazwaną „Przeglądem literatury”, rozpoczyna ogólna charakterystyka bakteriofagów typu P1 oraz ich strategii rozwojowych – począwszy od etapów adsorpcji faga do komórki bakteryjnej, wprowadzenia DNA do wnętrza bakterii i ustanowienia autonomicznego replikonu profaga, przejścia od lizogenii do cyklu litycznego, a skończywszy na mechanizmach składania potomnych wirionów i ich uwalniania w wyniku lizy komórki bakteryjnej. Niewątpliwie, korzystne byłoby przedstawienie w tym miejscu uproszczonego schematu ilustrującego organizację genetyczną genomu faga, z wyróżnieniem omawianych w tekście zespołów genów oraz elementów regulatorowych decydujących o wyborze danej ścieżki rozwojowej P1. Kolejne podrozdziały przynoszą opis systemów genetycznych odpowiadających za powielanie profaga i jego stabilne utrzymywanie w komórkach bakterii – a więc typowych również dla plazmidów systemów: replikacyjnego, partycyjnego, rozdziału form oligomerycznych i addycji. W dalszej kolejności zestawiono dane na temat zakresu specyficzności P1 względem bakterii z różnych grup taksonomicznych, charakterystykę szczepów bakterii, których interakcje z P1 analizowano w przedstawionej rozprawie, oraz przykłady praktycznego wykorzystania bakteriofaga P1 w badaniach naukowych. Zagadnienia te przedstawiono na tle odpowiednio dobranej, aktualnej bibliografii – w

całej pracy zacytowano łącznie 236 pozycji źródłowych. Lektura tej części rozprawy w wystarczającym stopniu wprowadza czytelnika do tematyki badań i stanowi odpowiednie tło dla postawionego przez Doktorantkę Celu badawczego.

W kolejnych rozdziałach szczegółowo opisano wykorzystane w badaniach Materiały i Metody. Realizacja zaplanowanych badań wymagała przygotowania licznych konstruktów plazmidowych i zmodyfikowanych wariantów genetycznych P1, a także wykorzystania licznych metod z zakresu mikrobiologii i genetyki, co świadczy o dobrze opanowanym warsztacie badawczym Doktorantki. Mam kilka uwag dotyczących tej części pracy: (a) w Tabeli nr 2 nie podano nazwy gatunkowej *E. coli* przy opisie szczepów tej bakterii, (b) w Tabelach nr 3 i 6 (i w całym tekście) stosowano trzyliterowy kod nazw markerów sekcyjnych pozachromosomowych replikonów, a zwyczajowo powinien być dwuliterowy (np. Kan → Km), ponadto (c) nie znajduję w tekście informacji o sposobie uzyskania logo dla zestawów porównywanych sekwencji.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę, przedstawione w rozdziale Wyniki, koncentrują się na trzech głównych wątkach tematycznych: (1) określeniu roli kaset partycyjnej (PAR) i addykcyjnej (TA) P1 w stabilnym utrzymywaniu plazmidopodobnej formy profaga w komórkach lizogenów, (2) identyfikacji rejonów genomu P1 dogodnych do klonowania fragmentów DNA, bez zaburzenia rozwoju litycznego bakteriofaga i stabilności profaga, oraz (3) określeniu użyteczności P1 jako narzędzia w badaniach genetycznych *P. agglomerans* i *A. tumefaciens*.

Ad. 1. W pierwszym etapie badań skonstruowano pochodne bakteriofaga ze zinaktywowanymi kasetami PAR i TA. Wykorzystanie całego replikonu P1 było dobrym posunięciem, pozwoliło bowiem na ocenę rzeczywistej roli obu kaset w biologii P1, a ponadto przyniosło nieoczekiwane wyniki sugerujące możliwość kompensacji utraty funkcji systemu partycji poprzez inaktywację kasety addykcyjnej. Jest to w mojej ocenie najciekawsza obserwacja tej części badań, wskazująca na możliwość bezpośredniego bądź pośredniego powiązania regulacyjnego systemów *maintenance* w genomie profaga. Według mojej wiedzy, opisano dotychczas w literaturze jednostkowy przypadek (plazmid pMBL6842 *Pseudoalteromonas rubra*; PNAS 2021; <https://doi.org/10.1073/pnas.2011577118>) ukazujący bezpośrednią negatywną regulację procesu inicjacji replikacji za pośrednictwem antytoksyny systemu addykcyjnego. Inaktywacja tego systemu wywoływała efekt analogiczny do opisanego w rozprawie – stabilizację replikonu, w tym przypadku w wyniku wzrostu liczby jego kopii w komórce. Ponieważ Doktorantka nie wspomina w Dyskusji o ww. artykule, poprosiłbym o przedstawienie pokrótce istoty opisanego mechanizmu regulacyjnego oraz o krytyczną opinię na temat możliwości występowania analogicznego mechanizmu w P1. Czy badano wcześniej obecność dodatkowych miejsc wiązania antytoksyny w obrębie genomu P1 bądź jego systemu replikacyjnego? Czy możemy przewidzieć te miejsca *in silico* na podstawie analiz sekwencji nukleotydowej profaga (?) – a jeśli tak, to z pewnością warto to uczynić.

Ad. 2. Drugi wątek badawczy powiązany jest z potencjałem wykorzystania genomu P1 jako nośnika egzogennej informacji genetycznej. Poszukiwanie bezpiecznych miejsc insercji w genomach fagów jest zwykle problematyczne ze względu na ścisłe upakowanie informacji genetycznej. Doktorantka dowiodła użyteczności dwóch takich regionów w P1 – wbudowanej sekwencji insercyjnej IS1 i genu

pdcb. Wyselekcjonowane naturalne mutacje transpozonowe w genomach funkcjonalnych fagów są najlepszym wskaźnikiem takich miejsc. Ponieważ genomy P1 i P7 są blisko spokrewnione, chciałbym zapytać, czy lokalizacja transpozonu Tn3 w genomie P7 może być wskazówką pomocną w identyfikacji kolejnego miejsca dogodnego do klonowania DNA w profagu P1?

Ad. 3. Istotnym wątkiem rozprawy było także zbadanie możliwości praktycznego wykorzystania bakteriofaga P1 w wybranych bakteryjnych gospodarzach. Testy przeprowadzone z wykorzystaniem *P. agglomerans* L15 przyniosły nieoczekiwane wyniki, wskazujące na istnienie w komórkach tego szczepu mechanizmu blokującego lizogenezę P1. W pełni zasadne było więc odczytanie kompletnej sekwencji nukleotydowej tego szczepu. Jej analiza przyniosła ciekawe obserwacje świadczące o występowaniu, w dwóch naturalnych plazmidach, genów/modułów genetycznych pokrewnych P1, które mogą potencjalnie determinować zjawisko niezgodności (*incompatibility; Inc*) (replikacyjnej bądź partycyjnej) z profagiem. Dzięki konstrukcji i analizie szczepów pozbawionych niektórych plazmidów, Doktorantka wskazała jako źródło fenotypu *Inc* plazmid pPagL15_3, niosący moduł REP, pokrewny systemowi replikacyjnemu P1. Plazmidy *P. agglomerans* L15 stanowią zatem ciekawy model badawczy, który z pewnością zasługuje na dalsze, bardziej szczegółowe analizy.

Podsumowując, Doktorantka zrealizowała postawione w rozprawie cele badawcze, uzyskując wyniki istotne dla oceny możliwości wykorzystania P1 jako narzędzia w badaniach testowanych bakterii. Za najistotniejsze osiągnięcia tej pracy należy uznać:

- wykazanie roli kaset partycyjnej i addykcyjnej w stabilnym utrzymywaniu profaga P1 w komórkach bakterii (wcześniej analizowano jedynie funkcje kaset wyodrębnionych z genomu P1 i sklonowanych w niestabilnych plazmidach testowych),
- identyfikację w genomie P1 regionów dogodnych do prowadzenia manipulacji genetycznych bez ryzyka zaburzenia podstawowych funkcji profaga,
- określenie sekwencji i struktury wieloreplikonowego genomu *P. agglomerans* L15,
- identyfikację w plazmidach szczepu L15 modułów genetycznych pokrewnych modułom P1, co może skłaniać do krytycznej interpretacji opisanych w literaturze nieudanych prób lizogenezacji bakteriofagiem P1 różnych gatunków/szczepów bakterii,
- uzyskanie wyników świadczących o tym, że plazmid pPagL15_3 i profag P1 należą do tej samej grupy niezgodności replikacyjnej,
- wykazanie możliwości transdukcji materiału genetycznego z komórek *E. coli* do *P. agglomerans*,
- zademonstrowanie międzygatunkowej transdukcji plazmidów za pomocą fagów typu P1.

W Dyskusji Doktorantka skonfrontowała uzyskane wyniki z danymi literaturowymi. Rozdział ten został napisany dojrzałe, a jego lektura przekonuje o ugruntowanej wiedzy Doktorantki z zakresu poruszanej tematyki. Całość rozprawy jest ciekawą lekturą, a niektóre opisane wątki badawcze skłaniają do kontynuacji badań nad profagiem P1. Aby zainicjować szerszą dyskusję podczas obrony rozprawy, chciałbym prosić Doktorantkę o odpowiedź na kilka dodatkowych pytań:

- Jakie jest znaczenie metylacji w inicjacji replikacji profaga P1? Czy wprowadzenie modyfikacji przez bakteryjną metylotransferazę Dam w origin replikacji jest warunkiem niezbędnym do

zapoczątkowania kolejnej rundy replikacyjnej? Genom P1 koduje własną metylotransferazę Dmt o specyficzności Dam. Jednak gen *dmt*, jak napisano we wprowadzeniu, znajduje się pod kontrolą represora C1, zatem jego ekspresja powinna być blokowana w trakcie lizogenii. Chętnie poznam opinię Doktorantki, czy brak bakteryjnej metylotransferazy typu Dam w komórkach *A. tumefaciens* (bakteria ta koduje CcrM – metylotransferazę o innej specyficzności niż Dam) może negatywnie wpływać na proces inicjacji replikacji profaga P1 w tym gospodarzu?

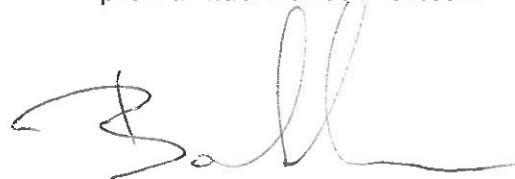
- Poprosiłbym również o wyjaśnienie mechanizmu przekazywania drogą transdukcji dużych plazmidów. W jaki sposób następuje ich cyklizacja w komórkach biorcy przy braku kolistej permutacji? Czy możliwe jest zapakowanie do kapsydu formy ccc plazmidu?
- Nie udało się usunąć plazmidu pPagL15_3 z komórek *P. agglomerans*, co było niespodziewanym wynikiem. Jakie dalsze eksperymenty należałoby zaplanować, aby poznać przyczynę tak wysokiej stabilności tego plazmidu.

Wniosek końcowy

Przedstawione w recenzji uwagi nie wpływają na moją ogólną pozytywną ocenę całości rozprawy. Rozprawa ta przynosi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim była ocena możliwości wykorzystania bakteriofaga w konstrukcji narzędzi genetycznych. Rozwiązanie tego problemu wymagało od Doktorantki szerokiej wiedzy z zakresu dyscypliny nauki biologiczne, opanowania odpowiedniego warsztatu badawczego, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz zdolności przeprowadzenia syntezy uzyskanych danych i wyciągnięcia na ich podstawie uprawnionych wniosków.

W mojej opinii, praca doktorska Pani mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek w pełni spełnia wymogi merytoryczne i redakcyjne stawiane rozprawom doktorskim, 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). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Giermasińskiej-Buczek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

prof. dr hab. Dariusz Bartosik



UNIWERSYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ BIOLOGII
INSTYTUT MIKROBIOLOGII
ZAKŁAD GENETYKI BAKTERII
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1
tel. (+48 22) 55 41 318; fax (+48 22) 55 41 402

PRIORYTET

Instytut Biologii
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa

*(Recenzja poprawy składowej)
Katedra Dyscypliny Nauki Biologicznej*

R

(00)459007734985245345
Poczta Polska
Opłata pobrana 10 zł — gr

