

Poznań, 2015.05.15

Prof. dr hab. Henryk Pospieszny
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Poznań, ul. W. Węgorka 20

OCENA

rozprawy doktorskiej Pana magistra Grzegorza Nowickiego, uczestnika Studiów Doktoranckich Wydziału Biologii UAM, zatytułowanej „Charakterystyka porównawcza nowo odkrytych bakteriofagów phD2B i En2 zakażających *Enterobacter nimipressuralis*”.

Bakteriofagi, patogeny bakterii, występują powszechnie i mogą potencjalnie odgrywać dużą rolę w kształtowaniu naturalnych ekosystemów. Praktycznie każda bakteria ma swojego wirusa, który w równym stopniu może być szkodliwy dla bakterii chorobotwórczych jak i pożytecznych. Ten drugi przypadek stymuluje badania nad możliwościami ochrony bakterii pożytecznych przed fagami, co jest istotne dla przemysłu głównie spożywczego ale także farmaceutycznego. Fagi dzięki odporności na antybiotyki mogą być wykorzystane w ograniczaniu występowania bakterii odpornych na antybiotyki i występujących w formie biofilmu. Ostatnio, ponownie wzrasta zainteresowanie tą formą terapii oraz sposobem biologicznej ochrony roślin przed patogenami bakteryjnymi. Środowisko wodne jest specyficzne, między innymi z względu na rozproszenie jego komponentów jak i otwarty wpływ otoczenia na tam panujące warunki. W różnych wymiarach dotyczy to innych naturalnych środowisk. Nasza wiedza o roli fagów w tych środowiskach jest wciąż ograniczona. Nasuwają także pytania o wirusy fitoplazm i mikoplazm, które są bakteriami bez ścian komórkowych, a dodatkowo nie można ich hodować na sztucznych pożywkach.

Wiele problemów związanych z fagami wciąż wymaga rozpoznania i pogłębienia. W tym kontekście dobór tematyki rozprawy doktorskiej uważam za trafny i uzasadniony.

Recenzowana praca w całości liczy 128 stron i ma układ klasyczny dla rozpraw doktorskich. Wstęp, napisany przejrzysto i przystępnie, stanowiąc dobre wprowadzenie w zagadnienia przedstawione w rozprawie (26 stron). W przeglądzie literatury Doktorant posiłkował się licznymi aktualnymi publikacjami z pośród 171 pozycji cytowanych w rozprawie. Na początku przeglądu literatury Autor podkreśla nie wątpliwie dużą rolę, chociaż nie w pełni rozpoznaną rolę fagów w środowisku. Zagadnienie to można było rozwinąć szerzej jako że ono jest mocnym argumentem za potrzebą rozpoznawania fagów i ich faktycznej roli w środowisku. To, że bakteriofagi szeroko występują w różnych, naturalnych i kształtowanych przez człowieka środowiskach nie musi zawsze oznaczać, że spełniają tam jakąś istotną rolę, np. w środowisku rolniczym. Cel pracy, który został sprecyzowany jako „wyczerpująca charakterystyka dwóch nowo odkrytych fagów infekujących *Enterobacter nimipressuralis*”, przez poznanie ich morfologii, struktury i organizacji genomu oraz analizę fagowych białek. Kolejne 30 stron pracy to opis metod i materiałów. Jest on obszerny oraz szczegółowy i może stanowić swoiste *practicum* dla początkujących pracowników naukowych w badaniach nad bakteriofagami. Wyniki są przedstawione na 37 stronach, w skład których wchodzi wiele rycin oraz tabel je dokumentujące. Opis wyników jest przejrzysty i jasno omówiony. Dyskusja umieszcza owe wyniki w kontekście literatury i krytycznie omawia je. Uzupełnieniem tej podstawowej struktury rozprawy doktorskiej są takie części jak: streszczenia w j. polskim i j. angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis treści.

Celem pracy wg. Doktoranta była w miarę możliwości jak najpełniejsza charakterystyka dwóch nowo odkrytych bakteriofagów. Oba fagi zostały wyodrębnione z 4 prób wody pobranej z Warty, w bliskim sąsiedztwie zrzutu wody z lewobrzeżnej oczyszczalni ścieków miasta Poznania oraz jednej próby wody z jeziora Góreckiego. Są to dwa diametralnie różne miejsca pozyskania wirusów. Autor wykazał, że oba bakteriofagi łączyło nie tylko środowisko wodne ale także wspólny gospodarz *Enterobacter nimipressuralis*. W tym miejscu ujawnia się u mnie skrzywienie wywołane doświadczeniem uzyskanym w pracy nad bakteriofagami bakterii patogenicznych dla roślin. W moim przypadku fagi były izolowane

bezpośrednio z konkretnego gatunku bakterii-gospodarza i najczęściej były wysoce specyficzne względem niego. W ocenianej pracy gospodarzem fagów jest najpowszechniej występująca bakteria w wodach jeziora Góreckiego i została jakby dopasowana do fagów pochodzących z różnych środowisk. Nie ma dowodu wprost, że to jest naturalny gospodarz, a raczej jeden z możliwych nie koniecznie najważniejszy dla niego. W jakimś stopniu jest ciekawe, że bardzo różne bakteriofagi porażają tego samego gospodarza, którego Doktorant zidentyfikował na podstawie testów biochemicznych i analizy sekwencji regionów genów markerowych jako *Enterobacter nimipressuralis*". (syn. *Lelliota nimipressuralis*). Fagi były identyfikowane i charakteryzowane na podstawie morfologii cząstek oraz szczegółowej analizy genomów. O ile wiadomo, że faga oznaczonego jako phD2B wyodrębniono z wody Jeziora Góreckiego to nie wiadomo z jakiego środowiska wyizolowano faga En2; można wnioskować, że prawdopodobnie z wód rzeki Warty. Badane fagi bardzo istotnie różnią się zarówno morfologicznie jak i wielkością genomów. Bakteriofag oznaczony jako phD2B posiada izometryczną główkę i krótki ogonek i należy do rodziny *Podoviridae* z kolei fag En2 ma wydłużoną główkę i długi, kurczliwy ogonek i można go zakwalifikować do rodziny *Myoviridae*. Oba fagi zawierają materiał genetyczny w postaci dwuniciowego DNA i bardzo istotnie różnią się wielkością genomów. Sekwencjonowanie genomów bakteriofagów przeprowadzono pirosekwencjonowaniem i oraz sekwencjonowaniem przez syntezę – Illuminą. Genom faga phD2B zawiera 44 104 pz a genom faga En2 składa się z aż 174 513 pz. Na genomach bakteriofagów Doktorant przeprowadził szczegółową identyfikację sekwencji kodujących białka. Dla ułatwienia analizy genomów badanych fagów przedstawił je na rycinach w postaci kolistej. Ustalono, że u obu wirusów sekwencje kodujące pokrywały 92% ich genomów. Pozycję taksonomiczną bakteriofagów phD2B En2 została ustalona na podstawie analizy skupień sekwencji genomowych z wykorzystaniem narzędzia CLANS. Punktem wyjścia analizy filogenetycznym było wcześniejsze przypisanie fagów do rodziny *Podoviridae* dla faga phD2B i *Myoviridae* dla faga En2 na podstawie ich morfologii. Analizę filogenetyczną przeprowadzono na podstawie porównania sekwencji kodujących główne białko kapsydu, polimerazę DNA, dużą podjednostkę terminazy oraz endolizynę, z których stworzono 4 drzewa filogenetyczne dla każdego badanego faga. Nie wnikając w szczegóły, bakteriofag phD2B w większości dendrogramów lokalizuje się w obrębie większej grupy innych fagów a co interesujące grupa ta jest

spokrewniona z fagami zakażającymi bakterię fitopatologiczną *Erwinia amylovora*. Z kolei bakteriofag En2 w każdej topologii drzew uzyskanych dla sekwencji białka kapsydu, polimerazy DNA oraz terminazy tworzy samodzielną gałąź w obrębie dużej grupy fagów. Topologia dendrogramu dla endolizy znacznie odbiega od pozostałych i fag En2 tworzy samodzielną gałąź znacznie oddaloną od kładu utworzonego bakteriofagi zakażające bakterie z rodzaju *Aeromonas*. Informacje te wskazują na stosunkowo wysoki stopień odrębności faga w odniesieniu do fagów jemu pokrewnych. Genomika porównawcza wykazała, że organizacja analizowanych genów fagów phD2B i En2 i blisko spokrewnionych z nimi jest bardzo podobna. Ważną częścią rozprawy są badania proteomiczne w ramach których przeprowadzono identyfikacje białek związanych z poszczególnymi etapami cyklu namnażania się fagów. Nie jest moim zadaniem opisywanie wszystkich nawet bardzo interesujących szczegółów bo te znajdują się w rozprawie ale jestem przekonany, że ich wartość będzie podstawą wartościowych prac naukowych, a być może dalszych badań. Dyskusja liczy 9 stron i wydaje się być dość zwięzła. Praca dotyczy charakterystyki porównawczej dwóch nowo rozpoznanych fagów i w takiej też konwencji jest dyskusja, która według mnie została przeprowadzona poprawnie. Z kolei posumowanie pracy jak dla mnie jest zbyt oszczędne. Ostatni punkt podsumowania być może jest prawdziwy ale chyba w tej pracy nie do końca potwierdzony na różnych wirusach i połączyłbym go z punktem pierwszym podsumowania.

Analizując wyniki badań przedstawione w recenzowanej pracy uważam, że postawiony we wstępie pracy cel został przez Doktoranta w pełni, wręcz wzorowo został zrealizowany. Z mojego punktu widzenia rozprawę czytałem z dużym zainteresowaniem ze względu na punkty biologiczne zarysowane w głębokim jeszcze tle ale ważne, dotyczące roli fagów w różnych naturalnych środowiskach oraz możliwości zastosowania fagów w biologicznym ograniczaniu populacji bakterii patogenicznych. Znajduję wspólne punkty z rolnictwem, przykładowo, najbardziej obiecujące fagi w biologicznym ograniczaniu występowania bakterii fitopatogenicznej *Ralstonia solanacearum*, należą właśnie do rodzin *Podoviridae* i *Myoviridae* tak jak fagi będące przedmiotem tej rozprawy. Jednak w opisie fagów brakuje mi ogólnej charakterystyki biologicznej mówiącej o ich efektywności litycznej. Nie chodzi mi o ich ekologię, bo to nie jest przedmiotem rozprawy ale o proste relacje pomiędzy

gospodarzem i fagiem jakie można wykazać w warunkach laboratoryjnych, a konkretnie wielkość i klarowność lysinek oraz dynamika lizy. Pytam o to też dlatego, że Doktorant w rozprawie badał skuteczność endoliz, istotnych w procesie lizy ścian komórek gospodarza i dla obu fagów otrzymał wyniki wskazującą na stosunkowo niską ich efektywność. Mam pytanie: czy jest to efekt natury metodycznej czy przypadkowego doboru gospodarza? Wiemy że zjawisko lizy wciąż nie do końca jest rozpoznane i wiemy także, że wytłumaczenie tego w sposób przedstawiony w pracy sprawy nie zamyka. Duże wrażenie robi liczba różnych metod i technik badawczych oraz narzędzi bioinformatycznych zastosowanych przez Doktoranta. Świadczy to o Jego doskonałym warsztacie badawczym, dużych umiejętnościach i pracowitości. W niniejszej pracy zauważyłem także drobne błędy redakcyjne, które zaznaczyłem w tekście oraz bardzo nieliczne, czasami dyskusyjne, nieścisłości które pozwalam sobie przedstawić w kilku punktach.

- We wstępie (str .17, wiersz 3) pomyłkowo podano, że wielkość genomów bakteriofagów waha się od 11,6 pz do 497 pz zamiast kpz. Traktuję to jako zwykłą pomyłkę.

- Zamiast „mozaicyzm genomów bakteriofagów” lepiej stosować określenie „mozaikowość genomów bakteriofagów „(str.34). Mam wrażenie, że mozaicyzm jako pojęcie genetyczne jeżeli już było stosowane to był raczej dla organizmów komórkowych niż wirusów. Sprawa dyskusyjna: mozaicyzm to mechanizm a efekt mozaikowość genetyczna.

- Str. 36. Mechanizm ewolucji - zamiast dryft genetyczny powinno być dryf genetyczny.

Powyższe uwagi, niekiedy dyskusyjne, nie obniżają wysokiej wartości merytorycznej recenzowanej pracy, która spełnia wszystkie wymagania stawiane przez ustawę o stopniach oraz tytułach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Biologii UAM w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Grzegorza Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w celu uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

