



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii



80-822 Gdańsk, ul. Kładki 24, tel: (+4858) 523 63 20; (+4858) 523 63 21; fax: (+4858) 523 64 30
www.biotech.ug.gda.pl



Prof.dr hab.Krystyna Bienkowska-Szewczyk
Uniwersytet Gdański
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMED
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Kładki 24, 80-822 Gdańsk
Tel. (58) 523 6381
Fax (58) 305 7312
e-mail: krysia@biotech.ug.gda.pl

Gdańsk, 5 czerwca 2015

Recenzja pracy doktorskiej P. Mgr. Grzegorza Nowickiego zatytułowanej:
Charakterystyka porównawcza nowoodkrytych bakteriofagów pH2B i En2
zakażających *Enterobacter nimipressuralis*

Przedmiotem pracy doktorskiej Pana Mgr Grzegorza Nowickiego jest identyfikacja i charakterystyka dwóch dotychczas nieznanych bakteriofagów izolowanych ze środowiska wodnego. Praca obejmuje określenie gospodarza badanych bakteriofagów oraz ich charakterystykę z wykorzystaniem metod mikrobiologicznych, sekwencjonowania, metod bioinformatycznych i spektrometrii masowej. Temat pracy wpisuje się w aktualny nurt narastającego ponownego zainteresowania bakteriofagami – mówi się o „bacteriophage rediscovery”- wynikający z napływu ogromnych ilości informacji uzyskanych dzięki rewolucyjnemu rozwojowi genomiki , a wskazujących na olbrzymią skalę obecności i roli tych wirusów w każdym środowisku biologicznym , od oceanu do wnętrza ciała ludzkiego. Drugą przyczyną tego zainteresowania jest narastająca lekooporność bakterii, co skłania do ponownego rozpatrywania możliwości ich zwalczania za pośrednictwem fagów, szczególnie w odniesieniu do biofilmów, stanowiących, jak obecnie wiemy, powszechnie występującą formą bytowania bakterii. Tzw. terapia fagowa była jednym z

najważniejszych elementów początkowego zainteresowania bakteriofagami, ale rola badań nad wirusami bakteryjnymi dla rozwoju wiedzy ogólnobiologicznej jest nie do przecenienia. Badania nad bakteriofagami rozpoczęły nowoczesną erę biologii molekularnej i przyniosły zarówno wiele odkryć dotyczących podstawowych mechanizmów biologicznych, jak i dostarczyły wielu narzędzi (np. enzymów) i metod, bez których niemożliwy byłby rozwój współczesnej biotechnologii. Kontynuacja studiów nad bakteriofagami w kontekście nowych możliwości badawczych stworzonych przez nowoczesne metody molekularne, szczególnie z zakresu genomiki i proteomiki, jest więc jak najbardziej celowa, a praca doktorska Mgr Nowickiego jest przykładem takich studiów.

W swojej pracy P. Mgr Nowicki wyizolował z wody jeziornej dwa bakteriofagi, których gospodarzem jest słabo poznana bakteria, należąca do rodziny *Enterobacteriaceae*, sklasyfikowana przez Autora jako *Enterobacter nimipressuralis*. Na podstawie analizy genomicznej Autor określił przynależność taksonomiczną tych wirusów, nazwanych phD2B i En2, do rodzin *Podoviridae* i *Myoviridae* z rzędu *Caudovirales*. Analiza genomiczna, na którą składają się sekwencjonowanie i składanie genomów fagowych, poszukiwanie sekwencji kodujących białka i przypisanie im funkcji biologicznych, a także analiza filogenetyczna, stanowią zasadniczą część pracy. Wyniki analizy genomicznej i bioinformatycznej zostały skonfrontowane z analizą proteomiczną wykonaną metodą spektrometrii mas. Dodatkowo Autor bardziej szczegółowo scharakteryzował białka obu fagów uczestniczące w lizie komórek bakteryjnych. Wynikiem pracy jest więc poznanie dwóch nowych mikroorganizmów, co stanowi autentyczne i rzetelne osiągnięcie badawcze. Sekwencja genomu bakteriofaga phD2B została przez Autora pracy opublikowana w czasopiśmie *Genome Announcements*, wydawanym przez Amerykańskie Towarzystwo Mikrobiologiczne (ASM).

Rozprawa doktorska P. Mgr Nowickiego liczy 128 stron i zawiera wszystkie rozdziały typowe i wymagane dla prac doktorskich, choć dystrybucja danych i tekstu pomiędzy rozdziałami nie jest w mojej opinii zawsze właściwa, ta uwaga dotyczy głównie rozdziałów: metody i wyniki. Pierwszą część rozprawy stanowi wstęp liczący 24 strony, z których większość poświęcona jest szczegółowemu opisowi etapów cyklu replikacyjnego bakteriofagów z trzech rodzin należących do rzędu *Caudovirales*. Ta część ma charakter pracy przeglądowej, (prawie podręcznikowej),

jest oparta na starannym doborze literatury, od pozycji niemal historycznych do współczesnych, aktualnych prac. Trochę mylące w tej części wstępu są powtarzające się identyczne tytuły podrozdziałów, (*Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*) dotyczące kolejnych etapów cyklu, takich jak składanie główki czy ogonka fagowego, co sprawia, że po pierwszym spojrzeniu na taki tytuł trudno rozróżnić, czego dotyczy dany podrozdział, byłoby czytelniej, gdyby te tytuły były doprecyzowane. Ta część wstępu stanowi wyczerpujące tło dla przeprowadzonej w pracy analizy porównawczej charakteru i funkcji białek nowo poznanych bakteriofagów. Ostatnie kilka stron części wstępu opisuje organizację genomu bakteriofagów oraz mechanizmy zmienności i ewolucji tych wirusów. Konstrukcja wstępu odzwierciedla w pewnym stopniu założenia części eksperymentalnej, wskazując, jakich informacji Autor poszukiwał, aby scharakteryzować nowo odkryte wirusy. Wstęp stanowi więc systematycznie zebrany zbiór informacji o bakteriofagach – brakuje jednak trochę w nim szerszego kontekstu, pokazującego co obecnie dzieje się w tej dziedzinie nauki, jakich najważniejszych odkryć dokonano, co wynika z lawiny nowych informacji genomicznych dotyczących fagów izolowanych z różnych środowisk i jakie są kierunki i cele tych badań.

Część eksperymentalna pracy opisana jest w rozdziałach „Metody” i „Wyniki”. Te dwa rozdziały składają się na wielopłaszczyznową charakterystykę badanych wirusów. Trzeba je czytać równolegle, gdyż opis samych wyników jest dość skrótowy i nie zawsze odzwierciedla wszystkie podejmowane zadania, szczególnie w pierwszej części, gdzie np. podrozdział „Charakterystyka bakteriofagów” rozpoczyna się od stwierdzenia, że wyizolowano dwa bakteriofagi, następnie wykonano badania metodą mikroskopii elektronowej, a następny temat to już sekwencjowanie genomowe i omówienie użytych technik bioinformatycznych. Nie ma informacji o namnożeniu fagów, o tym, jak uzyskano fagowe DNA, o wstępnych analizach. Czytelnik musi tu samodzielnie odtworzyć kolejność zdarzeń, sięgając do metod, gdzie można odnaleźć opisy tych etapów pracy i domyślić się, kiedy były w pracy zastosowane. W wypadku wirusów wyizolowanych po raz pierwszy, ta wstępna mikrobiologiczna charakterystyka powinna być - moim zdaniem - dokładniej opisana w wynikach. Autor wspomina w metodach o rozdziale genomowego DNA w żelu agarozowym, szkoda, że te wyniki nie zostały pokazane w rozprawie. Czy wykonano też analizę restrykcyjną genomów fagowych? Czy zostały określone krzywe wzrostu

(klasyczny „one step growth experiment”)? Jak wyglądały lysinki? Czy były próby zakażenia nowo odkrytymi fagami innego gospodarza?

Pierwszym elementem charakterystyki nowo poznanych bakteriofagów prezentowanym w pracy są zdjęcia obydwu wirusów wykonane techniką mikroskopii elektronowej. To bardzo istotny wynik, który umożliwił Autorowi ocenienie wielkości cząstek wirusowych obu fagów i wstępne określenie ich przynależności taksonomicznej do rodzin *Podoviridae* i *Myoviridae* na podstawie cech morfologicznych. Następnym etapem było sekwencjonowanie genomów fagów phD2B i En2, wykonane w specjalistycznym laboratorium, które także dokonało składania genomów. Ten ostatni proces jest kluczowy dla uzyskania poprawnej sekwencji – jak oceniano jakość odczytu, jaka była ilość i długość odczytów?

Kluczowym elementem dalszej pracy było określenie organizacji genomu badanych fagów, identyfikacja sekwencji kodujących białka i przypisanie im funkcji. Ważną decyzją jest tu wybór metod analizy bioinformatycznej, P. Mgr Nowicki starał się korzystać z kilku narzędzi, tak, aby móc weryfikować uzyskane dane. Wybory te okazały się trafne, gdyż Autorowi udało się zidentyfikować główne geny kodujące białka strukturalne i enzymatyczne fagów phD2B i En2 i powiązać je w funkcjonalne moduły. Wiele sekwencji nie zostało zidentyfikowanych i są określone jako białka hipotetyczne, co jest zrozumiałe, gdyż nawet dla najlepiej poznanych bakteriofagów takich jak T4, nie wszystkie geny są poznane. Analiza porównawcza wskazała, że fag phD2B wykazuje cechy zbliżone do bakteriofaga SP-6, podczas gdy dla faga En2 punktem odniesienia był bakteriofag T4. Wyniki adnotacji genomu zostały przedstawione w postaci kolistych map, przedstawiających zidentyfikowane białka oraz regiony funkcjonalne w genomach obydwu fagów (błąd w podpisach dotyczących tych rysunków i zastosowanych kolorów). Załączone zostały także szczegółowe wydruki z listą wszystkich odnalezionych genów i białek, co jest odzwierciedleniem procesu adnotacji genomu, ale brakuje tu opisu uzyskanych wyników, który można znaleźć dopiero w dyskusji. W tej części pracy, aby zrozumieć i docenić wyniki projektu, trzeba czytać równolegle wyniki i dyskusję, bo same wyniki są przedstawione w sposób raczej ogólnikowy. Adnotacja genomu i następujące po niej analizy filogenetyczne i porównawcze składają się na pełną charakterystykę genomyczną nowo poznanych wirusów bakteryjnych i stanowią trzon projektu Mgr Nowickiego. Dodatkowym ciekawym wynikiem była identyfikacja intronu w genomie

faga phD2B. Pytanie : czy analizy bioinformatyczne wykonane zostały przez Autora samodzielnie, czy przy współpracy z wyspecjalizowanymi firmami?

Charakterystyka proteomiczna fagów , rozpoczęta przez analizę elektroforetyczną białek pochodzących z oczyszczonych wirionów fagowych oraz z komórek zakażonych fagami, oparta była głównie na spektrometrii mas. Wyniki (przedstawione w formie tabel) potwierdzają w znacznej części (84% dla faga phD2B i 37% dla fag En2) dane uzyskane z analiz *in silico* , co wskazuje na precyzję tych analiz i potwierdza sprawność Autora w posługiwaniu się narzędziami bioinformatycznymi . Metody identyfikujące geny oraz funkcje ich produktów nie są w pełni doskonałe i rezultaty uzyskane *in silico* mogą odbiegać od rzeczywistości. Idealnym rozwiązaniem byłoby potwierdzenie eksperymentalne wszystkich uzyskanych informacji, co oczywiście nie jest możliwe w skali jednego projektu . Mgr Nowicki wybrał produkty dwóch genów, kodujących endolizyny badanych fagów, do eksperymentalnej analizy biochemiczno- funkcjonalnej. Jak Autor uzasadnia wybór tych dwóch białek do analizy eksperymentalnej? Geny endolizyn zostały sklonowane, ich ekspresja została przebadana *in vitro*, rekombinowane białka zostały oczyszczone, a ich aktywność potwierdzono metodą zymografii. Tu również wyniki są podane nieco zbyt pobieżnie, bo dopiero powrót do opisu metod wskazuje, że badane białka zostały poddane fuzji ze znacznikiem histydynowym. Można się więc domyślić, że przeciwciała anti-His tag zostały użyte w metodzie Western blotting, bo tej informacji brakuje przy ilustracjach pokazujących wyniki immunoblottingu.

Ostatnim rozdziałem rozprawy jest dyskusja, w której Mgr Nowicki przedstawił opis i interpretację uzyskanych w pracy danych. Dyskusja zawiera wyczerpujące rozważania na temat różnych aspektów uzyskanych wyników oraz zastosowanych technik badawczych w świetle danych znanych z literatury. Trochę w niej brakuje przytoczenia przykładów podobnych prac, tj izolacji i charakterystyki bakteriofagów uzyskanych z różnych ekosystemów, w tym ze środowiska wodnego. Jak można porównać rozwój tego typu badań np. z badaniami nad bakteriofagami tworzącymi tzw „human virome” ?

Od strony edytorskiej, praca jest napisana w większości starannie, poprawną polszczyzną, choć interpunkcja raczej nie jest mocną stroną Autora. Jest trochę błędów typowo edytorskich, jak błędne końcówki wyrazów , czy niezręczności w

rodzaju „polimeraza RNA funkcjonuje w kierunku nakierowania procesów transkrypcji...”. Autor pomylił też numery odnośników i wszędzie tam, gdzie odwołuje się do numerów metod (czyli do rozdziału 4) podaje numery zaczynające się od 3. W rozdziale o adnotacji genomu pojawiła się niezgodność numerów rysunków od 4 do 7 z podpisami i oznaczeniem kolorów.

Moje uwagi krytyczne w większości odnoszą się do organizacji materiału zawartego w rozprawie, a nie jej treści i wartości merytorycznej, którą oceniam wysoko.

Rozprawa doktorska P. Mgr Nowickiego pozwala ocenić Autora jako samodzielnego badacza naukowego, zdolnego do zaproponowania i przeprowadzenia doświadczeń pozwalających na rozwiązanie oryginalnego problemu naukowego. Wyniki opisane w pracy zostały już częściowo opublikowane w międzynarodowym czasopiśmie.

Doktorant jest także współautorem innych artykułów, co stanowi znaczący dorobek publikacyjny. Podsumowując, uważam, że praca P. Mgr Nowickiego jest rzetelnym wkładem w badania nad biologią wirusów bakteryjnych i w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Wnioskuje zatem do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana Mgr Nowickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na omówione walory naukowe pracy wnioskuje także o jej wyróżnienie.

