

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 02.05.2022r.

Dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG  
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych  
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
Uniwersytet Gdański,  
Tel.: +48 58 523 6333  
Fax: +48 58 523 6426  
E-mail: [robert.czajkowski@ug.edu.pl](mailto:robert.czajkowski@ug.edu.pl)

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik zatytułowanej:  
„Badanie funkcji biologicznych białek ogonka bakteriofagów *Yersinia enterocolitica*”,  
wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Brzozowskiej.

Fagoterapia (inaczej terapia fagowa, terapia wykorzystująca wirusy bakteryjne) jest jedną z najstarszych opisanych i scharakteryzowanych naukowo metod leczenia zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt. Pierwsze wykorzystanie bakteriofagów w leczeniu zakażeń u ludzi datuje się na lata 20 XX wieku. Mniej więcej od tego czasu, fagoterapia rozwijała się intensywnie i wielowątkowo, aż do momentu odkrycia i powszechnego zastosowania pierwszych antybiotyków. Dzisiaj, w XXI wieku, mniej więcej po około stu latach od pierwszego zastosowania fagoterapii, z uwagi na coraz powszechniejsze występowanie szczepów bakterii opornych na większość znanych antybiotyków, pomysł zastosowania wirusów bakteryjnych jako alternatywy dla antybiotyków, zyskuje coraz większe uznanie w światowej medycynie i nauce.

Wysoka skuteczność fagoterapii, a zarazem jej podstawowa zaleta, dotyczy specyficzności wirusów bakteryjnych względem infekowanych szczepów bakterii. Najczęściej bakteriofagi są w stanie zainfekować (i zabić) tylko bakterie jednego gatunku albo tylko niektóre szczepy bakterii w obrębie gatunku, nie infekując innych (nawet relatywnie blisko spokrewnionych), często również pożytecznych szczepów bakterii przebywających w tym samym środowisku.

Wysoka specyficzność bakteriofagów wynika ze swoistych interakcji białek fagowych i białek występujących na powierzchni komórek bakterii, które stanowią receptory rozpoznawane przez bakteriofaga. Molekularne interakcje białek bakteryjnych i wirusowych oraz ich dopasowanie

determinują możliwość zajścia infekcji i jej przebieg, a w szerszej perspektywie także sukces adaptacyjny i ewolucyjny bakteriofaga w środowisku.

Pomimo wzrastającego zainteresowania badaniami molekularnymi dotyczącymi interakcji bakteriofagów i bakterii, nasza wiedza o specyficznej interakcji struktur białkowych obu partnerów biorących udział w takiej interakcji (wirus-bakteria) jest często niewystarczająca.

Na przykład, nie wszystkie funkcje białek budujących kapsyd, poza funkcją strukturalną zostały szczegółowo scharakteryzowane, a wiedza taka byłaby przydatna np. do opracowania nowych metod detekcji i eliminacji patogenów bakteryjnych.

Przedstawiona mi do recenzji Rozprawa Doktorska Pani mgr Karoliny Filik została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Ewy Brzozowskiej, w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Rozprawa doktorska podejmuje temat charakterystyki strukturalnej oraz analizy funkcji biologicznych białek ogonka bakteriofagów infekujących bakterie *Yersinia enterocolitica* pod kątem ich właściwości enzymatycznych, adhezyjnych oraz możliwości aplikacyjnego wykorzystania tych białek w detekcji i zwalczaniu *Y. enterocolitica*. Modelem badawczym wybranym przez Doktorantkę do analizy roli białek ogonkowych były dwa bakteriofagi należące do rodziny *Podoviridae*: bakteriofag  $\phi$ 80-18 i bakteriofag  $\phi$ YeO3-12.

Pomimo faktu, że zarówno bakterie *Y. enterocolitica* jak i bakteriofagi specyficzne dla tych bakterii były zarówno w przeszłości jak i są obecnie przedmiotem licznych badań, ciągle niewiele jest wiadomo o innych funkcjach białek ogonka bakteriofagów *Y. enterocolitica*, poza ich funkcją podstawową - to znaczy wspomagającą inicjację infekcji (efektywne rozpoznanie gospodarza, kontakt wirus-gospodarz, przyłączenie wirusa do powierzchni bakteryjnego gospodarza). Co więcej, prace doświadczalne poświęcone charakterystyce funkcjonalnej i aplikacyjnemu zastosowaniu białek ogonka bakteriofagów, infekujących bakterie *Y. enterocolitica* w detekcji i zwalczaniu patogena, nie są tak liczne, jak te, dotyczące innych patogenów ludzi i zwierząt (np. *Pseudomonas aeruginosa* i *Listeria monocytogenes*). Z tego względu uważam temat pracy doktorskiej podjęty przez Doktorantkę nie tylko za bardzo interesujący naukowo, ale także stwarzający możliwości rozwoju nowych aplikacyjnych (praktycznych) metod detekcji i zwalczania tego ważnego patogena ludzi i zwierząt.

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Filik została przygotowana zasadniczo w języku angielskim i częściowo również w języku polskim (Streszczenie, CV naukowe) i ma układ typowy dla rozpraw doktorskich przygotowanych w postaci tzw. kompilacji (zbioru, cyklu) artykułów



naukowych. Rozprawa stanowi zestawienie czterech oryginalnych, spójnych tematycznie, eksperymentalnych artykułów opublikowanych w latach 2020 - 2022 w czasopismach naukowych z listy Journal Citation Report (JCR): Scientific Reports, Frontiers in Microbiology, Molecules i AMB Express. Ponadto, w skład Rozprawy wchodzi: krótkie Streszczenie w języku polskim oraz krótkie Streszczenie w języku angielskim (Abstract), oba zawierające opis założeń i celów pracy oraz omówienie i podsumowanie każdego z artykułów naukowych rozprawy doktorskiej i najważniejszych otrzymanych wyników (najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej). Do Rozprawy dołączone zostało także CV naukowe Doktorantki w języku polskim z wykazem publikacji, projektów i konferencji naukowych, w których brała udział.

Wszystkie zaprezentowane artykuły naukowe, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, są pracami wieloautorskimi, co jest typowe dla opracowań z zakresu nauk biologicznych i pokrewnych. Publikacje te posiadają od pięciu do jedenastu autorów, a dwie z nich (publikacja w Frontiers in Microbiology i publikacja w AMB Express) powstały jako rezultat współpracy międzynarodowej polskiego zespołu naukowego w którym pracowała Doktorantka. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor; IF) tych prac wynosi 17,728, a liczba punktów MEiN/MNiSW równa się 410.

Ważnym elementem dysertacji są oświadczenia współautorów, dołączone do każdego z artykułów, które jednoznacznie wskazują na ważną rolę mgr Karoliny Filik w planowaniu eksperymentów, przeprowadzeniu doświadczeń, opracowywaniu wyników, przygotowaniu rycin i tabel oraz planowaniu i redagowaniu publikacji naukowych, wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Wkład Doktorantki w powstanie czterech artykułów naukowych został oszacowany (zależnie od publikacji) na poziomie od 30 do 66%. W jednej z czterech prac Doktorantka jest zarówno autorem pierwszym jak i autorem do korespondencji (corresponding author) (publikacja w Frontiers in Microbiology), w następnej pierwszym autorem (publikacja w AMB Express), a w kolejnych, odpowiednio drugim (publikacja w Molecules) i trzecim (publikacja w Scientific Reports). W świetle przedstawionych danych i oświadczeń współautorów, zestawienie wyżej wspomnianych prac eksperymentalnych w taki sposób, aby tworzyły spójną tematycznie rozprawę doktorską, nie budzi moich wątpliwości.

Cztery artykuły naukowe stanowiące rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Filik, przed opublikowaniem ich w periodykach naukowych, podlegały wnikliwym i rygorystycznym recenzjom (peer-review) specjalistów w zakresie tematyki badań, jak również edycji przez edytorów naukowych czasopism i uzyskały ich pozytywne opinie i rekomendacje do publikacji. Nie jest zatem zasadne i konieczne w mojej opinii, omawianie w/w artykułów naukowych pod kątem użytej

metodologii i prezentacji wyników badań oraz ich strony edytorskiej. W mojej recenzji skupię się natomiast na merytorycznych aspektach tych prac.

Pierwsza praca (Pyra et al., 2020, *Scientific Reports*) dotyczyła analizy funkcji enzymatycznej białka TTPAgp11 (Tail Tubular Protein A) bakteriofaga  $\phi$ Ye03-12. Białka ogonkowe bakteriofagów homologiczne do białka TTPAgp11 (np. białko gp31 z bakteriofaga infekującego bakterie *Klebsiella pneumoniae* KP32) posiadają aktywność enzymatyczną  $\alpha$ -1,4-glukozydazy, a co za tym idzie są dwufunkcyjne (funkcja strukturalna i enzymatyczna). Aby zweryfikować hipotezę o dwufunkcyjności białka TTPAgp11, Autorzy wykonali szereg żmudnych analiz: sklonowali gen kodujący białko TTPAgp11, wyprodukowali białko w bakteriach *Escherichia coli*, oczyścili je oraz zanalizowali jego funkcje z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej i chromatografii gazowej. Autorzy pracy jednoznacznie wykazali, że białko ogonkowe TTPAgp11 posiada aktywność enzymatyczną  $\alpha$ -1,4-glukozydazy.

Jak sama Doktorantka pisze w Streszczeniu pracy doktorskiej, białka ogonkowe są niezwykle różnorodne, co wynika z mechanizmów adaptacyjnych bakteriofagów, a szerzej, także koewolucji wirusów i bakterii. Taka wysoka różnorodność utrudnia przewidywanie ich funkcji tylko i wyłącznie na podstawie homologii sekwencji nukleotydowej, która często nie jest konserwowana (albo konserwowana w niewystarczającym stopniu). Nasuwa się tutaj następujące pytanie:

- Czy możliwe byłoby przewidywanie funkcji enzymatycznej i potencjalnych substratów tych białek na podstawie ich homologii strukturalnej (przestrzennej)? Jak takie analizy można byłoby przeprowadzić?

Druga praca (Filik et al., 2020, *Frontiers in Microbiology*) dotyczyła charakterystyki bakteriofaga  $\phi$ 80-18 należącego do rodziny *Podoviridae* i infekującego bakterie *Y. enterocolitica* serotyp O:8, szczep 8081. Praca ta jest efektem współpracy grup badawczych z Polski i Finlandii. Autorzy scharakteryzowali faga  $\phi$ 80-18 pod kątem szeregu parametrów istotnych w jego interakcji z bakteriami *Y. enterocolitica in situ* (w czasie infekcji), to jest określili zakres gospodarza, zsekwencjonowali i zanalizowali jego genom, wykonali badania proteomiczne białek strukturalnych budujących kapsyd faga  $\phi$ 80-18, określili stabilność kapsydów w zakresie temperatury i pH środowiska, wykonali eksperymenty typu „one-step growth” oraz określili przynależność filogenetyczną tego bakteriofaga. Co warto nadmienić, pomimo faktu, że bakteriofag  $\phi$ 80-18 został po raz pierwszy opisany dość dawno temu, bo w latach 90 XX wieku, praca ta jest pierwszą tak dokładną charakterystyką tego wirusa. Praca ta nie zawiera



eksperymentów typu „challenge”, które pokazywałyby możliwości kontroli bakterii *Y. enterocolitica* poprzez aplikację bakteriofaga  $\phi$ 80-18. Jak rozumiem, takie eksperymenty nie były założonym celem tej pracy i dlatego nie zostały zaplanowane w trakcie prac laboratoryjnych. Nasuwa się zatem w tym miejscu następujące pytanie:

- Czy Doktorantka mogłaby zaplanować teoretycznie i przedstawić pokrótce eksperyment (albo eksperymenty), gdzie mogłaby jednoznacznie wykazać efekt ochronny zastosowania bakteriofaga  $\phi$ 80-18 przeciwko bakteriom *Y. enterocolitica* np. na modelu mysim?

Trzecia publikacja (Pyra et al., 2020, *Molecules*) dotyczyła analiz dwóch białek bakteriofagowych TTPAgp12 i TFPgp17 bakteriofaga  $\phi$ YeO3-12. Do tej pory oba te białka były uznawane za białka strukturalne. Autorzy pracy potwierdzili eksperymentalnie, że oba białka posiadają również właściwości enzymatyczne, w tym hamują wzrost bakterii, a także hamują powstawanie biofilmu tworzonego przez *Y. enterocolitica*. Jak sami Autorzy zaznaczają w pracy, molekularny mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej białek TTPAgp12 i TFPgp17 bakteriofaga  $\phi$ YeO3-12 nie został (jeszcze) poznany, dlatego nasuwają się tutaj następujące pytania:

- Jakie eksperymenty należałoby zaplanować aby z jak największym przybliżeniem/prawdopodobieństwem określić mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej tych obu białek?
- Czy na podstawie swoich wyników badań oraz innych, dostępnych danych literaturowych, Doktorantka mogłaby zaproponować teoretycznie mechanizm molekularny w wyniku którego białka TTPAgp12 i TFPgp17 (albo białka homologiczne) hamują wzrost bakterii i przeciwdziałają formowaniu się biofilmu?

Ostatnia (czwarta) publikacja (Filik et al., 2022, *AMB Express*) dotyczyła charakterystyki białka TFPgp17 z bakteriofaga  $\phi$ YeO3-12 i jego wykorzystania do celowanej, szybkiej i specyficznej detekcji bakterii *Y. enterocolitica* serotypu O:3. Serotyp O:3 jest rozpowszechniony między innymi w Europie (w tym w Polsce), gdzie jest odpowiedzialny za przypadki jersiniozy u ludzi najczęściej po spożyciu zakażonego mięsa wieprzowego. Autorzy pracy zaproponowali użycie zmodyfikowanego białka TFPgp17 w systemie typu ELISA, gdzie białko to po specyficznym przyłączeniu się do komórek bakterii mogło być wykrywane przez odpowiednie przeciwciała. Tak

zaproponowany i zaprojektowany biosensor byłby w stanie specyficznym wykrywać bakterie *Y. enterocolitica* serotyp O:3 w środowisku. Autorzy określili specyficzność i wrażliwość opracowanej metody. Zaproponowany test wykrywał specyficznym bakterie o serotypie O:3 na poziomie około  $10^5$  komórek w środowisku. Wynik taki stwarza szansę, w mojej opinii, na komercjalizację tego rozwiązania w przyszłości. Co więcej, wyniki otrzymane przez Autorów sugerują, że wykorzystanie białek bakteriofagowych do detekcji różnych patogenów bakteryjnych (w tym *Y. enterocolitica*), może stać się rzeczywistą alternatywą dla testów wykorzystywanych obecnie w diagnostyce patogenów bakteryjnych. Nasuwają mi się tutaj następujące pytania:

- Czy zaproponowana metoda detekcji wykrywałaby także martwe komórki *Y. enterocolitica*? Jeżeli Autorzy pracy tego nie sprawdzali, to jak taki eksperyment mógłby zostać zaplanowany i przeprowadzony?
- Jak szybko bakterie *Y. enterocolitica* serotyp O:3 zyskują oporność na bakteriofaga  $\phi$ YeO3-12?
- Czy spontanicznie fagooporne szczepy *Y. enterocolitica* posiadają obniżoną wirulencję, czy też może istnieją udokumentowane przypadki, gdzie wirulencja takich wariantów fagoopornych szczepów jest podwyższona? Jak można byłoby wytłumaczyć zmiany w poziomie wirulencji fagoopornych wariantów bakterii *Y. enterocolitica*?

Wszystkie cztery oryginalne prace eksperymentalne, przedstawione jako kolejne rozdziały pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik i przybliżone przeze mnie pokrótce powyżej w mojej recenzji, reprezentują wysoki poziom naukowy. Prace te posiadają również walory aplikacyjne.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Filik stanowi oryginalny i ważny wkład Doktorantki w tematykę badania molekularnych podstaw interakcji wirusów bakteryjnych i ich gospodarzy, szczególnie bakteriofagów infekujących bakterie z gatunku *Y. enterocolitica*.

Praca doktorska została prawidłowo, rzetelnie i merytorycznie zaplanowana, przedstawia spójny i interesujący ciąg myślowy, a co najważniejsze, prowadzi do istotnych odkryć naukowych. Co należy podkreślić, wyniki badań zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych o dobrych i bardzo dobrych parametrach bibliograficznych, to znaczy o wysokim współczynniku



odziaływania (Impact Factor IF: od 3.298 do 5.640) oraz o wysokiej lokacie punktowej na liście MEiN/MNiSW (od 70 do 140 punktów). Pomimo opublikowania tych prac stosunkowo niedawno (2020-2022), artykuły te były już kilkakrotnie cytowane - co również pokazuje ich wysoką wartość naukową.

Pani mgr Karolina Filik posłużyła się w swojej pracy szerokim warszatem metodycznym, między innymi z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, technik badania i obrazowania białek, chromatografii i statystyki. Jakość przeprowadzonych badań i analiz pozwala mi stwierdzić, że Doktoranta cechuje się biegłością w stosowaniu tego warsztatu.

Podobnie jak każda inna dobra praca naukowa, także ta, pozwala na wyznaczenie nowych celów badawczych i analizę nowych problemów naukowych.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) i dlatego też **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Filik do dalszych etapów obrony rozprawy doktorskiej.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość poznawczą i aplikacyjną przeprowadzonych badań oraz opublikowanie wyników pracy w uznanych periodykach naukowych, **wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik stosowną nagrodą.**

Z wyrazami szacunku,



dr hab. Robert Czajkowski, prof. UG  
Gdańsk, 02.05.2022 r.