

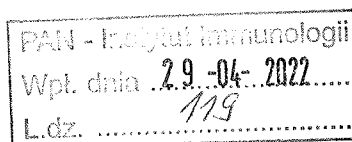
Prof. dr hab. Alicja Węgrzyn

Gdańsk 19.04.2022 r

Pracownia Terapii Fagowej

Instytutu Biochemii i Biofizyki

Polskiej Akademii Nauk



Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik

pt: "Badanie funkcji biologicznych białek ogonka bakteriofagów *Yersinia enterocolitica*".

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Karoliny Filik została wykonana w Instytucie Immunologii i Terapii i Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN pod opieką naukową Pani dr hab. Ewy Brzozowskiej w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej.

Praca w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej z pewnością zdecydowała o wyborze tematu pracy doktorantki, który koncentrował się wokół zakażeń wywołanych przez bakterie należące do gatunku *Yersinia enterocolitica*. Rezerwuarem tego patogenu są zwierzęta hodowlane a głównie świnie, które często przechodząc bezobjawowe zakażenie stają się źródłem skażenia mięsa i wyrobów mięsnych co w konsekwencji prowadzi do infekcji ludzi czyli jersinioza jest chorobą odzwierzęcą, powodującą najczęściej bóle brzucha, nudności, wymioty, gorączkę i biegunkę. Bakterie często infekują dzieci, osoby starsze bądź ludzi z obniżoną odpornością wynikającą z innych schorzeń bądź stosownych terapii, w takich przypadkach często przebieg zakażenia wymaga hospitalizacji. Niestety rozpoznanie jersiniozy w chwili obecnej stanowi poważne wyzwanie pod względem diagnostycznym, czasowym jak i finansowym a co za tym idzie liczba odnotowywanych przypadków zachorowań jest z pewnością zaniżona. Wyróżnia się kilka najczęściej występujących i najbardziej zjadliwych serotypów *Yersinia enterocolitica* takich jak O:3, O:8, O:9, O:5 czy 27, które wykazują geograficzny rozkład a mianowicie serotyp O:3 i O:9 najczęściej występują w Europie i Japonii. W związku z powyższym informacjami wybór modelu badawczego w postaci *Yersinia enterocolitica* serotyp O:3 jak i poszukiwanie skutecznych metod jej zwalczania oraz szybkich i wiarygodnych sposobów jej identyfikacji są ze wszech miar uzasadnione.

W chwili obecnej UE poświęca wiele uwagi zwalczaniu infekcji wywoływanych przez wielolekooporne bakterie przy użyciu ekologicznych a zarazem

skutecznych metod. Niewątpliwie w ten nurt wpisuje się terapia z użyciem bakteriofagów. Niestety unijne przepisy prawne pozwalają na stosowanie terapii fagowej tylko w przypadku zagrożenia życia bądź jako terapii eksperymentalnej przeprowadzanej pod nadzorem lekarza i za zgodą pacjenta.

W tej sytuacji dobrą alternatywą wydają się być prace nad wykorzystaniem pojedynczych białek fagowych takich jak lizyny czy depolimerazy w celu eliminacji patogennych bakterii. W ten nurt wpisują się naukowe poczynania Pani dr hab. Ewy Brzozowskiej oraz jej podopiecznych. Dodatkowo są to molekularne badania nad bakteriofagami, które w chwili obecnej są prowadzone przez niewiele zespołów w Europie stąd tym bardziej są cenne i pożądane.

Tytuł rozprawy doktorskiej brzmiący „Badanie funkcji biologicznych białek ogonka bakteriofagów *Yersinia enterocolitica*” jest mało precyzyjny dlatego, że Doktorantka charakteryzowała trzy białka pochodzące od jednego faga a nie kilku fagów oraz dodatkowo zamieściła pracę opublikowaną w *Frontiers in Microbiology* będącą pełną charakterystyką biochemiczną, genetyczną, molekularną i filogenetyczną faga phi 80-18, w której nie ma doświadczeń poświęconych białkom strukturalnym faga i w/g mojej opinii praca ta nie powinna być dołączona do cyklu pozostałych trzech, bowiem jest niespójna tematycznie.

W skład rozprawy doktorskiej Pani Karoliny Filik wchodzi cztery publikacje:

1. „Biochemical features of the novel Tail Tubular Protein A of *Yersinia* phage phiYeO3-12”. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11 autorstwa: Pyra A, Urbańska N, Filik K, Tyrlik K, Brzozowska E. z 2020 r.
2. „The *Podovirus* phi 80-18 Targets the Pathogenic American Biotype 1B Strains of *Yersinia enterocolitica*”. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1356 autorstwa: Filik K, Szermer-Olearnik B, Wernecki M, Happonen L, Pajunen M, Nawaz A, Qasim M, Jun J, Mattinen L, Skurnik M, Brzozowska E. z 2020 r.
3. „New Insights on the Feature and Function of Tail Tubular Protein B and Tail Fiber Protein of the Lytic Bacteriophage phi HeO3-12 Specific for *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3”. *Molecules*, 25(19), 4392 autorstwa: Pyra A, Filik K, Szermer-Olearnik B, Czarny A, Brzozowska E. z 2020 r.
4. „Phi YeO3-12 phage tail fiber Gp17 as a promising high specific tool for recognition of *Yersinia enterocolitica* pathogenic serotype O:3”. *AMB Expr.* 12, 1 autorstwa: Filik K, Szermer-Olearnik B, Niedziółka-Jonson J,

Roźniecka E, Ciekot J, Pyra A, Matyjaszczyk I, Skurnik M, Brzorzowska E. z 2022r.

Wszystkie prace stanowiące rozprawę doktorską są wieloautorskie co wymagało zamieszczenia deklaracji twórców odnośnie ich wkładu w powstanie poszczególnych artykułów. W obecnie obowiązującej ustawie nie ma konieczności określania procentowego udziału poszczególnych autorów w powstawaniu pracy ale otrzymałam do oceny wersję gdzie twórcy opisali typ doświadczeń jakie wykonywali oraz przypisali sobie procentowy udział w powstaniu danego manuskryptu, zatem jestem zobowiązana do ich oceny. Na podstawie udziału procentowego jaki przypisali sobie poszczególnie autorzy nie jestem w stanie rzetelnie ocenić ich faktycznego wkładu w powstanie danej pracy, podam jeden przykład: z oświadczeń dotyczących pracy zamieszczonej w *Scientific Report* wynika, że pierwszy autor ma przypisany 50% udział, drugi 10% a trzeci aż 30% gdzie metodologia stosowana przez autorów była podobna a autor korespondujący tylko 5% udział. W związku z powyższym uprzejmie proszę Doktorantkę o przedstawienie podczas publicznej obrony swojego wkładu pracy, w następujący sposób, aby opisała przy rycinach zawartych w poszczególnych publikacjach swój faktyczny udział podając doświadczenia jakie wykonała. Umożliwi to nie tylko mi ale również Komisji oceniającej Doktorantkę rzetelny wgląd w proces tworzenia prac.

Celem prac prowadzonych przez Doktorantkę była biochemiczna, enzymatyczna oraz strukturalna charakterystyka dwóch białek ogonka oraz białka włókna faga phi YeO3-12 celem wykorzystania ich w zwalczaniu i identyfikacji bakterii *Yersinia enterocolitica* serotyp O:3. Geny kodujące białka zostały sklonowane do systemu ekspresyjnego, białka były nadprodukowane i oczyszczone.

Jako pierwsze pod względem funkcji i mechanizmu działania przebadano białko TTPAgp11. Użyto skrobi (red-starch) i maltozy jako substratów w testach trawienia z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej i chromatografii gazowej, które udowodniły, że posiada aktywność hydrolityczną względem badanych substratów co pozwoliło na sklasyfikowanie go do rodziny enzymów alfa-1,4-glukozydaz. Właściwość ta pozwala przypuszczać, że białko to może skutecznie degradować bakteryjny biofilm. Doświadczenia te potwierdziły wcześniejsze doniesienia zespołu dr hab. Ewy Brzozowskiej o podwójnej funkcji białek ogonków fagowych a mianowicie strukturalnej i enzymatycznej.

Dodatkowo porównano strukturę pierwszorzędową TTPAgp11 z białkami innych fagów namnażających się na bakteriach z rodzaju *Yersinia* oraz faga T7. Wykazało 80% podobieństwo do białka Gp11 i Gp31 pochodzących z faga T7 i małe podobieństwo do białek innych fagów infekujących bakterie z rodzaju *Yersinia*.

W następnej kolejności scharakteryzowano białka TTPBgp12 (Tail Tubular Protein B) oraz TFPgp17 (Tail Fiber Protein). Do tej pory przebadano pod względem struktury i funkcji jedno białko TTPA kodowane przez faga phi YeO3-12 a następnie przetestowano kolejne dwa w poszukiwaniu odpowiedzi czy inne białka strukturalne faga posiadają dodatkowe funkcje enzymatyczne i antybakteryjne? Doktorantce nie udało się określić funkcji enzymatycznej białka TTPBgp12 zatem bardzo proszę o przedstawienie na obronie propozycji doświadczeń, które należałoby wykonać aby skutecznie zweryfikować aktywność enzymatyczną wyżej wspomnianego białka. Na uwagę zasługuje fakt, że białko TTPBgp12 hamuje wzrost bakterii jak również spowalnia rozwój biofilmu stąd moja prośba o przedstawienie planów badawczych, które pozwoliły określić mechanizm działania białka zarówno na bakterie jak i na biofilm.

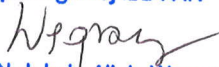
Przeanalizowano sekwencję nukleotydową, aminokwasową obu białek za pomocą programu BLAST, Clustal Omega i HH Pred, która wykazała podobieństwo na poziomie 99-100% do innych białek TTPB i TFP bakterii z rodzajów *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter* czy *Klebsiella*.

Ostatnia część pracy pani Karoliny Filik dotyczyła zastosowania białka TFPgp17 do specyficznego wykrywania serotypu O:3 *Yersinia enterocolitica* czyli jako wydajnego i specyficznego narzędzia diagnostycznego. Specyficzność i czułość wiązania przez białko TFPgp17 została sprawdzona testem ELISA z wykorzystaniem innych serotypów bakterii z rodzaju *Yersinia* oraz bakterii należących do innych gatunków takich jak *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko znacznikowi jakie posiadało białko i złota koloidalnego. Wyniki wyżej wymienionych doświadczeń stworzyły potencjalną możliwość użycia białka TFPgp17, jako biosensora do wykrywania *Yersinia enterocolitica* serotyp O:3. Użycie białka TFPgp17 jako bioczuJNIKA umożliwia identyfikację tylko jednego serotypu bakterii (wprawdzie tego najczęściej występującego w Europie ale tylko jednego) stąd moja prośba o przedstawienie propozycji Doktorantki jak powinno być skonstruowane narzędzie diagnostyczne do wykrywania kilkunastu

serotypów *Yersinia enterocolitica*. Kolejna moja prośba do Doktorantki dotyczy możliwości porównania podczas obrony wad i zalet proponowanej nowej metody diagnostycznej z wykorzystaniem białka TFPgp17 z normą ISO do oznaczania bakterii z rodzaju *Yersinia* jak również PCR i MALDI TOF.

W podsumowaniu mojej recenzji chciałbym zaznaczyć, że nie mam uwag co stosowanej metodyki oraz interpretacji wyników i uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Filik spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r., poz. 1668, z późniejszymi zmianami). Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Zakładając, że zgodnie z panującymi zwyczajami przyznawania pierwszego miejsca na liście autorów artykułów osobom mającym kluczowy wkład w ich powstanie, mogę sądzić, iż Pani Karolina Filik odegrała wiodącą rolę w procesie tworzenia artykułów i potrafi samodzielnie rozwiązywać problemy naukowe. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Komisji ds. Stopni Naukowych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Filik do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK PRACOWNI
Terapii Fagowej IBB PAN


prof. PAN dr hab. Alicja Węgrzyn