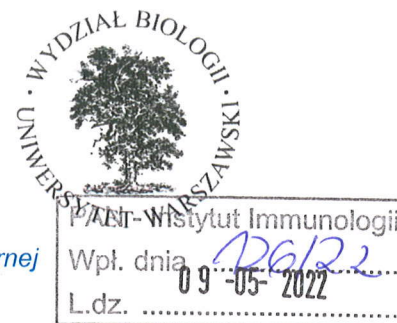




UNIwersytet  
Warszawski

Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii, Zakład Mikrobiologii Molekularnej  
dr hab. Adrianna Raczkowska



Warszawa, dn. 29.04.2022

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik

pt.: „Study of biological functions of *Yersinia enterocolitica* bacteriophage tail proteins”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Karoliny Filik została wykonana pod kierunkiem dr hab. Ewy Brzozowskiej z Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk. Rozprawa przedłożona do oceny składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu publikacji wchodzących w skład dysertacji, kopii publikacji wraz z oświadczeniami współautorów, wykazu osiągnięć naukowych oraz przebiegu kariery naukowej. Wyniki badań będące przedmiotem dysertacji zawarto w czterech pracach opublikowanych w latach 2020-2022 w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports:

1. Filik, K., Szermer-Olearnik, B., Wernecki, M., Happonen, L. J., Pajunen, M. I., Nawaz, A., Qasim, M. S., Jun, J. W., Mattinen, L., Skurnik, M., & Brzozowska, E. (2020). The Podovirus  $\phi$ 80-18 Targets the Pathogenic American Biotype 1B Strains of *Yersinia enterocolitica*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1356.
2. Pyra, A., Urbańska, N., Filik, K., Tyrlik, K., & Brzozowska, E. (2020). Biochemical features of the novel Tail Tubular Protein A of *Yersinia* phage  $\phi$ YeO3-12. *Scientific Reports*, 10(1), 4196.
3. Pyra, A., Filik, K., Szermer-Olearnik, B., Czarny, A., & Brzozowska, E. (2020). New Insights on the Feature and Function of Tail Tubular Protein B and Tail Fiber Protein of the Lytic Bacteriophage  $\phi$ YeO3-12 Specific for *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(19), 4392.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa  
tel.: 22 55 41 310, faks: 22 55 41 402  
e-mail: ad.raczkowska@uw.edu.pl  
<http://www.biol.uw.edu.pl>

4. Filik, K., Szermer-Olearnik, B., Niedziółka-Jönson, J., Roźniecka, E., Ciekot, J., Pyra, A., Matyjaszczyk, I., Skurnik, M., & Brzozowska, E. (2022).  $\phi$ YeO3-12 phage tail fiber Gp17 as a promising high specific tool for recognition of *Yersinia enterocolitica* pathogenic serotype O:3. *AMB Express*, 12(1), 1.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) czasopism, w których opublikowano ww. prace wynosi 17,73, zaś suma punktów MEiN (2021) - 410. Wszystkie prace są wieloautorskie, co jest typowe dla obszernych prac badawczych, mają odpowiednio od 5 do 11 współautorów. Pani mgr Karolina Filik jest pierwszym autorem dwóch prac oraz współautorem dwóch kolejnych. Z oświadczeń złożonych przez Doktorantkę oraz współautorów wynika, że mgr Karolina Filik miała znaczący udział w powstaniu prac (30-66%). Udział doktorantki obejmował współtworzenie koncepcji pracy, planowanie i wykonanie badań eksperymentalnych, analizę i interpretację wyników, przeprowadzenie analiz statystycznych, przygotowanie figur i tabel, pierwszych wersji manuskryptów oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów. Można zatem zakładać, że spełnione zostały ustawowe warunki formalne, jakie stawiane są obecnie rozprawom doktorskim. Należy również nadmienić, że badania zaprezentowane w pracach były finansowane ze środków projektu NCN, Sonata Bis7, którego kierownikiem jest dr hab. Ewa Brzozowska, opiekun naukowy doktorantki.

Rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Filik dotyczy charakterystyki białek ogonka dwóch bakteriofagów *Y. enterocolitica* O:3 tj.  $\phi$ YeO3-12 oraz  $\phi$ 80-18, określeniu ich właściwości enzymatycznych oraz adhezyjnych. Badania wzbogacono również o charakterystykę właściwości biologicznych samego bakteriofaga  $\phi$ 80-18, który do tej pory był mało poznany. Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej, w aspekcie aplikacyjnym, była ocena możliwości zastosowania białek ogonkowych w diagnostyce *Y. enterocolitica*, jak również w fagoterapii.

*Y. enterocolitica* jest ludzkim enteropatogenem, czynnikiem etiologicznym jersiniozy, odzwierzęcej choroby zakaźnej układu pokarmowego z szerokim spektrum postaci chorobowych. Jest też czwartą, po kamylobakteriozie, salmonellozie oraz infekcjach wywołanych przez *Escherichia coli* STEC, zoonozą pod względem częstości występowania w Europie (wg raportu EFSA 2019). *Y. enterocolitica* to bardzo zróżnicowany gatunek obejmujący sześć biotypów (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) i ponad pięćdziesiąt serotypów. W Europie i Chinach najbardziej rozpowszechnione są serotypy O:3 i O:9, podczas gdy w Stanach Zjednoczonych dominuje serotyp O:8. Wśród wielu czynników zjadliwości tego enteropatogenu znajduje się lipopolisacharyd LPS, składnik błony zewnętrznej.

Jak wykazały liczne badania bakteriofagi mogą wykorzystywać jako receptory zarówno białka występujące w błonie zewnętrznej jak i sam LPS. Wśród tych oddziałujących z LPS są bakteriofagi  $\phi$ YeO3-12 oraz  $\phi$ 80-18 *Y. enterocolitica*, będące obiektami badań powyższej dysertacji. Biorąc pod uwagę zarówno niezmiernie ważną rolę ekologiczną odgrywaną przez bakteriofagi, jak również ogromne zainteresowanie tymi wirusami ze względu na możliwość ich zastosowania w biotechnologii oraz medycynie, charakterystyka biologiczna nieopisanych dotąd fagów oraz poznanie funkcji ich składowych białek jest bardzo istotnym celem naukowym.

W pierwszej z publikacji przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej przedstawiono analizę genomu i proteomu, jak również charakterystykę biologiczną bakteriofaga  $\phi$ 80-18. Określono jego stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury oraz wyznaczono tempo wzrostu. Przeprowadzono wizualizację cząstek fagowych w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Analiza filogenetyczna potwierdziła przynależność  $\phi$ 80-18 do rodziny *Podoviridae*. Natomiast analizy zakresu gospodarza wykazała, że ten bakteriofag może infekować oprócz *Y. enterocolitica* O:8 również serotypy O:4, O:4,32, O:20 i O:21. Te właściwości  $\phi$ 80-18 czynią go potencjalnym kandydatem do dalszych badań nad możliwością jego wykorzystania w celu eliminacji tego enteropatogenu z produktów spożywczych. W pracy wspomniano również o białku ogonka faga, które wydaje się być dobrym kandydatem do specyficznego wykrywania *Y. enterocolitica* O:8.

W kolejnych pracach skupiono się na charakterystyce dwóch białek tubularnych i jednego włókienkowego ogonka bakteriofaga  $\phi$ YeO3-12, tj. TTPAgp11, TTPBgp12, oraz TFPgp17, które jak się okazało oprócz funkcji strukturalnej czy budulcowej mogą pełnić funkcje enzymatyczne oraz adhezyjne. Przeprowadzone testy biochemiczne wykazały, że TTPAgp11 wykazuje aktywność hydrolityczną wobec skrobi i maltozy, co sugeruje, że enzym ten można zaliczyć do rodziny  $\alpha$ -1,4-glukozydaz. Testy fałdowania i agregacji wykazały, że TTPAgp11 jest białkiem jednodomenowym, którego agregację może indukować maltoza lub GlcNAc (N-acetyloglukozamina). Struktura przestrzenna TTPAgp11 wydaje się przypominać strukturę pierwszego opisanego dwufunkcyjnego TTPA, a mianowicie TTPAgp31, który został wyizolowany z faga 32 *Klebsiella pneumoniae*. Z kolei dla białka TTPBgp12 nie udało się wyznaczyć specyficzności substratowej. Wykazano natomiast, że jest to białko dwudomenowe w przeciwieństwie do białka jednodomenowego, TFPgp17. Zaobserwowano również, że TFPgp17 jest znacznie bardziej stabilniejszym białkiem niż TTPBgp12, chociaż w przypadku obydwu tych białek obecność cukrów przyczynia się do ich agregacji. Dodatkowo przeprowadzona obszerna analiza bioinformatyczna ujawniła podobieństwo TFPgp17 do bakteryjnego białka RsaA obecnego w warstwie S niektórych bakterii, co świadczy o ewolucyjnym przystosowaniu się wirusa do skutecznego infekowania swojego bakteryjnego gospodarza.

Ciekawa obserwacja dotyczyła hamującego wpływu TTPBgp12 oraz TFPgp17 na wzrost *Y. enterocolitica* w postaci biofilmu. Otrzymane wyniki sugerują, że obydwa białka ogonkowe mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako czynniki hamujące proces tworzenia biofilmu.

Kolejny aspekt badań dotyczył właściwości adhezyjnych białka ogonka TFP-Gp17 faga  $\phi$ YeO3-12. Po raz pierwszy wykazano, że białko to jest wysoce specyficzną adhezyną oddziałującą z powierzchnią komórki *Y. enterocolitica* O:3, a wyizolowane i oczyszczone białko ogonkowe niosące znacznik 6His-MBP (maltose binding protein) można wykorzystywać do wykrywania tego enteropatogenu. Wykazano również, że adhezyna ta oddziałuje z dwoma głównymi składnikami śluzu tj. GalNAc (N-acetylogalaktozamina) i GlcNAc (N-acetyloglukozamina), co sugeruje, że aminocukry stabilizują cząsteczki faga w przewodzie pokarmowym ssaków. Okazuje się, że adhezyny fagowe rozpoznające w specyficzny sposób bakteryjnych gospodarzy mogą być doskonałym narzędziem diagnostycznym, zwłaszcza w diagnostyce patogenów trudnych w hodowli w warunkach laboratoryjnych.

Czytając pracę nasunęło mi się kilka pytań, proszę o ustosunkowanie się do nich Doktorantki:

1. Wyniki otrzymane w jednej z publikacji wskazują na udział białek ogonkowych TTPBgp12 i TFPgp17 w hamowaniu wzrostu *Y. enterocolitica* w postaci biofilmu. W jaki sposób mógłby wyglądać mechanizm ich działania?
2. Czy znane są mechanizmy oporności *Y. enterocolitica* na infekcje fagowe? Jak to zjawisko pokrótce wygląda w przypadku innych enterobakterii?
3. Czy znane są sekwencje profagowe w zdeponowanych genomach różnych serotypów *Y. enterocolitica*?

Podsumowując, chciałam wyrazić swoje duże uznanie dla osiągnięć Pani mgr Karoliny Filik. Rozprawa doktorska reprezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny, dlatego oceniam ją bardzo wysoko. Na wyjątkową wartość dysertacji składa się metodyczne i kompleksowe analizy genetyczne, proteomiczne, biochemiczne, mikrobiologiczne, mikroskopowe oraz szeroki zakres analiz bioinformatycznych, co przyczyniło się do uzyskania ważnych i oryginalnych wyników, które z kolei mogą zostać wykorzystane zarówno w badaniach naukowych, fagoterapii czy w diagnostyce mikrobiologicznej.

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 13 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz.595 z póź. zm.) i uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Zatem, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Filik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny zaprezentowanych badań skutkujący ich opublikowaniem w renomowanych czasopismach oraz wartość poznawczą i aplikacyjną uzyskanych wyników, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Filik stosowną nagrodą.



dr hab. Adrianna Raczkowska