



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

---

Wrocław, 2022-06-28

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska  
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej  
Polska Akademia Nauk  
ul. Weigla 12  
53-114 Wrocław  
tel. +48 71 3371172 wew. 316  
email: dabrowska@hirszfeld.pl

#### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Necel

pt. „Morfologiczna i molekularna charakterystyka bakteriofaga vB\_Eco4M-7,  
wirulentnego wobec patogennych bakterii *Escherichia coli* O157:H7”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Necel została wykonana pod opieką promotorską Pana prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna oraz promotor pomocniczej Pani dr Sylwii Bloch, w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Jest to znany i uznany polski ośrodek naukowy, mający szczególne osiągnięcia w zakresie biologii molekularnej bakteriofagów, w tym izolacji i charakterystyki szczepów fagowych o dużym znaczeniu praktycznym. Grupa promotora pracy, Profesora Węgrzyna, wniosła szczególny wkład w zrozumienie działania bakteriofagów kodujących toksyny Shiga i ich interakcji z enterokrwotocznymi szczepami bakterii. Są to szczepy powodujące ostre biegunki, ciężkie stany zapalne, a także poważne powikłania, w tym zespół hemolityczno-mocznicowy. Ze względu na to, jak poważne jest związane z tymi szczepami zagrożenie zdrowotne, badania te mają bardzo duży potencjał aplikacyjny i znaczenie praktyczne. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska należy do tego właśnie obszaru tematycznego i ona również wnosi oryginalny wkład w budowanie strategii ochronnych i terapeutycznych mających





przeciwdziałać zagrożeniu powodowanemu przez patogenne i wysoce wirulentne bakterie *Escherichia coli*.

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy nowego, wyizolowanego przez gdański zespół bakteriofaga vB\_Eco4M-7, który okazał się zdolny do lizy *E. coli* O157:H7, będącego groźnym szczepem enterokrwotocznym. Rozprawa została wykonana w formie zbioru trzech oryginalnych publikacji naukowych. Na pozytywne podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich tych pozycjach Doktorantka pełni rolę pierwszego autora. Taka forma doskonale spełnia nie tylko wymogi formalne, a także współczesne oczekiwania dotyczące eksperymentalnych prac doktorskich. Cykl opatrzone polskojęzycznym i angielskojęzycznym streszczeniem, załączono informację o dorobku naukowym Doktorantki, załączono szczegółowe oświadczenia dotyczące wkładu autorskiego w powstanie poszczególnych publikacji stanowiących element cyklu.

Pierwsza z prac wchodzących w skład przedstawionego cyklu została opublikowana w piśmie *Scientific Reports* w roku 2020, a Doktorantka jest jej pierwszym autorem. Praca ma charakter oryginalny i przedstawia szczegółową charakterystykę genomową, morfologiczną i podstawową charakterystykę mikrobiologiczną nowego bakteriofaga będącego przedmiotem rozprawy. Zapoznajemy się w niej z organizacją genomu, analizą filogenetyczną, anotacją wspartą analizą metodą spektroskopii mas, morfologią wirionów, zakresem specyficzności faga, a wreszcie charakterystyką adsorpcji i amplifikacji faga w hodowli bakteryjnej. Jest to szeroka i kompletna analiza, pozwalająca na ulokowanie nowego fagowego izolatu na tle znanych wcześniej fagów, w tym identyfikację podobieństw i różnic, a także najważniejszych cech o znaczeniu praktycznym. Przykładem takich cech jest potwierdzenie litycznego charakteru bakteriofaga, potwierdzenie braku genów kodujących czynniki wirulencji bakterii, a także stwierdzone podobieństwo do bakteriofaga vB-ECML-117 mającego już zastosowanie komercyjne.

Druga praca przedstawionego cyklu została opublikowana w piśmie *Toxins (Basel)* w roku 2021, Doktorantka pełni w niej rolę pierwszego autora. Praca ma charakter oryginalny i dotyczy dalszej charakterystyki faga vB\_Eco4M-7. Wykonane zostały badania potencjalnej toksyczności faga w stosunku do komórek ssaków i potwierdzono brak negatywnych



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

efektów traktowania komórek bakteriofagiem. Ma to duże znaczenie ze względu na perspektywę stosowania tego bakteriofaga jako czynnika przeciwbakteryjnego, co zarówno w terapii jak i ochronie żywności musiałoby prowadzić do ekspozycji ludzi lub zwierząt na ten szczep fagowy. Wykazano również zdolność badanego faga do propagacji w obniżonej temperaturze. Przedstawiono też szereg ciekawych obserwacji dotyczących zależności pomiędzy warunkami hodowli i wartością współczynnika wielokrotności zakażenia, a efektywnością hodowli faga. Wskazano też na powstawanie mutantów bakteryjnych niewrażliwych na szczep faga vB\_Eco4M-7.

Trzecia praca cyklu została opublikowana w piśmie *Antibiotics* w roku 2022, a Doktorantka również w tej pozycji pełni rolę pierwszego autora. Praca ma charakter oryginalny i stanowi kontynuację prac opisanych poprzednio. Charakterystykę faga vB\_Eco4M-7 rozwinęto tu o bardzo ciekawą analizę ewentualnych aktywności skojarzonych, w tym z innymi fagami oraz z antybiotykami. Nie jest to problem trywialny, ponieważ w wypadku gospodarzy bakteryjnych jakimi są enterokrwotoczne szczepy bakteryjne nie trafione postępowanie terapeutyczne będzie skutkowało indukcją profagów Stx i w konsekwencji produkcją toksyn Shiga, co może mieć dramatyczne skutki dla pacjenta. Dlatego Doktorantka przeprowadziła badania kilku antybiotyków oraz spokrewnionego faga i zidentyfikowała właściwe kombinacje, które nie skutkowały indukcją niekorzystnych profagów. Badanie objęło warunki likwidacji biofilmu i pozwoliło wykazać, że bakteriofag vB\_Eco4M-7 posiada dobre zdolności jego usuwania. Na docenienie zasługuje dyskusja obejmująca m.in. próbę teoretycznej identyfikacji genów fagowych kodujących białka mające znaczenie dla degradacji biofilmu.

Przedstawiony do oceny cykl prac oceniam wysoko, reprezentują one bardzo dobry poziom naukowy i dotyczą oryginalnych, ważnych z punktu widzenia naukowego zagadnień. Wszystkie opublikowano w dobrych pismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, a Doktorantka w każdej z nich jest pierwszym autorem. Na szczególne podkreślenie zasługuje spójność tematyczna cyklu, w którym kolejne prace stanowią wyraźną kontynuację poprzednich. Prace wykonano najnowszymi metodami dostępnymi w dziedzinie i dowodzą one wysokich umiejętności technicznych oraz biegłości w pracy laboratoryjnej. Dlatego nie





wnoszę poważnych uwag merytorycznych do ocenianej rozprawy, a moje pytania dotyczą raczej rozszerzenia podanych w rozprawie informacji lub drobnych korekt.

1. Pierwsza praca cyklu objęła oryginalne obserwacje dotyczące nowego szczepu fagowego i jego szczegółowej charakterystyki. We wstępie znalazła się informacja, że w genomie tego faga nie wykryto obecności „genów kodujących czynniki antybakteryjne” – zakładam, że jest to przejęzyczenie i chodziło raczej o geny bakteryjnego pochodzenia mogące potencjalnie wywierać efekt toksyczny na organizmy wyższe? Klasyfikacja taksonomiczna lokuje nowy szczep fagowy w historycznej już rodzinie *Myoviridae*, warto byłoby uzupełnić informację, jak lokuje się on w nowej taksonomii wirusów bakteryjnych. Bardzo ciekawa jest obserwacja, że fag ten powodował efektywniejszy spadek liczby komórek gospodarza w porównaniu z podobnym fagiem vB-ECML-117 – czy można zaproponować wyjaśnienie, czym powodowana jest ta różnica?
2. Do drugiej pracy zawartej w ocenianym cyklu, przedstawiającej ciekawe wyniki szerokiej charakterystyki mikrobiologicznej mam dwa pytania ogólne: jakie są zdaniem Doktorantki główne, możliwe mechanizmy molekularne powstawania bakteryjnych mutantów opornych na infekcję tym konkretnym fagiem, a także co wiadomo o molekularnych uwarunkowaniach wzrostu fagów *E. coli* w relatywnie niskich temperaturach, na przykład 12°C?
3. Trzecia praca cyklu prezentuje wyniki o dużym znaczeniu praktycznym, ponieważ wskazuje na potencjalnie użyteczne i bezpieczne kombinacje faga vB\_Eco4M-7 z antybiotykami i innym fagiem. Chciałabym dopytać, jakie przesłanki zastosowano do wybrania przebadanych w pracy rodzajów antybiotyków, a także jakiej aktywności możemy się hipotetycznie spodziewać po ich innych, nieprzebadanych jeszcze grupach?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

## Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą stwierdzam, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników z nawiązką spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Przeprowadzone badania dowodzą wysokich umiejętności i wiedzy w zakresie biologii i genomiki bakteriofagów oraz ich praktycznego przełożenia na rozwiązania ważne z punktu widzenia problemów medycznych.

Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą oryginalny wkład w dziedzinę jaką są badania bakteriofagów o potencjale terapeutycznym. Rozprawa została napisana zrozumiale, starannie, kompletnie. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia w mojej ocenie wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Necel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

### Wniosek o wyróżnienie rozprawy

Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy, jako uzasadnienie wskazując oryginalność przeprowadzonych badań, ich bardzo wysoki poziom naukowy, a także duże znaczenie praktyczne związane z perspektywą terapeutycznych i dezynfekcyjnych zastosowań opisanego bakteriofaga, zwalczającego enterokrwotoczne szczepy bakteryjne.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska  
kierownik  
LABORATORIUM BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ BAKTERIOFAGÓW  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN  
Wrocław

