



# UNIwersYTET MEDYCZNY

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

dr hab. Ewa Dworniczek  
Katedra i Zakład Mikrobiologii  
Wydział Lekarski,  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Ul. Chałubińskiego 4,  
50-368 Wrocław

Wrocław 2.09.2024r

### RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Korkusa,  
pt.: Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni*,**

wykonanej w Katedrze Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Konsumenta, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pod kierunkiem naukowym promotor dr hab. inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej prof. UPWr.

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr. Jakuba Korkusa stanowi pismo przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, z dnia 25 czerwca 2024r.

#### **Zasadność podjętej tematyki**

Zakażenia o etiologii *Campylobacter jejuni* to bez wątpienia znaczący problem epidemiologiczny w XXI wieku. Jego rozwiązanie jest ważnym wyzwaniem nie tylko dla poprawy bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności ale też dla zmniejszenia obciążenia ekonomicznego, które wynika z leczenia, hospitalizacji czy utraty produktywności spowodowanej zakażeniem tymi drobnoustrojami.

Kampylobakterioza w wielu krajach jest jedną z najczęściej zgłaszanych chorób. W Europie, rocznie odnotowuje się około 230 000 przypadków. Polska, na co wskazuje Autor dysertacji znajduje się wśród państw o jednym z najniższych wskaźników zgłaszanych przypadków kampylobakteriozy (3,7/100 tys). Jednak biorąc pod uwagę charakter i przebieg choroby wydaje się, że prawdopodobną przyczyną wyniku odbiegającego od średniej europejskiej, jest raczej brak powszechnej diagnostyki kampylobakteriozy, jak również niezgłaszanie się pacjentów do placówek służby zdrowia.

Wprawdzie większość przypadków zapalenia żołądka i jelit powodowanych przez *Campylobacter* ma tendencje do samoograniczania i tylko nieznaczny odsetek pacjentów wymaga hospitalizacji to jednak u rosnącej liczby osób z niedoborami odporności zakażenie może mieć przebieg poważny, uogólniony (bakteriemia/sepsa). Dodatkowo, w świetle

aktualnej wiedzy, infekcje *Campylobacter* mogą prowadzić do rozwoju chorób autoimmunologicznych.

Zakażenia powodowane przez dominujący u ludzi gatunek *Campylobacter jejuni* wymagają zaangażowania licznych czynników zjadliwości tych bakterii, których rola w patogenezie wciąż podlega badaniom. Jednym z najważniejszych mechanizmów wirulencji, który warunkuje przetrwanie *Campylobacter* w niekorzystnym środowisku, np. w trakcie farmakoterapii, jest zdolność do tworzenia biofilmu. Struktura ta dzięki swojej złożonej i nie do końca zdefiniowanej charakterystyce, zwiększa tolerancję komórek na czynniki stresowe i, jak się uważa, odgrywa kluczową rolę w przenoszeniu patogenów na ludzi. Tak więc dalsze badania nad powstawaniem biofilmu są niezbędne. Powinny one udoskonalić strategie zapobiegawcze i terapeutyczne, które skutecznie ograniczą przenoszenie *Campylobacter* za pośrednictwem łańcucha pokarmowego.

Wobec powyższego, tematyka rozprawy doktorskiej mgr. J. Korkusa, która dotyczy molekularnych mechanizmów tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni*, a w szczególności, oceny roli genów *cydB* i *hydC* w procesie powstawania biofilmu, jest aktualna i w pełni uzasadniona.

### **Struktura rozprawy doktorskiej**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zawarta jest na 97 stronach i ma formę manuskryptu, który został podzielony na 7 rozdziałów poprzedzonych stroną tytułową, spisem treści, wykazem skrótów i streszczeniem. W dwóch pierwszych rozdziałach znajdują się wstęp i cel pracy. Opis dokonań badawczych jest zawarty w rozdziałach 3-5, na które składają się zastosowane materiały i metody, wyniki i dyskusja. W końcowej części rozprawy zamieszczono wnioski i bibliografię (173 pozycje). Streszczenie pracy doktorskiej jest przedstawione w językach polskim i angielskim, a pozostałe jej części w języku polskim. Układ pracy jest dobrze przemyślany, a jej kolejne etapy zachowują ciąg przyczynowo-skutkowy.

### **Merytoryczna ocena rozprawy**

W liczącym 15 stron Wstępie Doktorant scharakteryzował bakterie rodzaju *Campylobacter* uwzględniając ich pozycję taksonomiczną, morfologię i fizjologię. We wprowadzeniu Autor zamieścił aktualny (styczeń 2024) wykaz znanych gatunków tego rodzaju wraz ze źródłami ich izolacji. Dalsza część Wstępu poświęcona jest epidemiologii zakażeń *C. jejuni*. Została opisana strona kliniczna kampylobakteriozy, źródła i rezerwuary *Campylobacter* oraz drogi transmisji. Przedstawiono również, na podstawie danych WHO, częstość występowania zakażeń powodowanych przez *C. jejuni* na świecie, w odniesieniu do wieku pacjentów i obszaru geograficznego. Występowanie kampylobakteriozy w Europie, z uwzględnieniem liczby osób hospitalizowanych i zmarłych, zostało szczegółowo opisane w odniesieniu do poszczególnych państw. W kolejnej części Autor przedstawił aktualną wiedzę na temat etapów patogenezy zakażeń *C. jejuni* oraz opisał znane modele badawcze pozwalające śledzić jej przebieg. Szczegółowo zostały opisane adhezyny umożliwiające kolonizację tkanek, toksyna CDT mogąca mieć związek z ostrym przebiegiem zakażenia, a także mechanizmy wnikania bakterii do komórek gospodarza.

W tej części prezentującej znaczenie *Campylobacter* od strony klinicznej, zabrakło jednak danych na temat rosnącej oporności tych bakterii na antybiotyki, np. makrolidy czy fluorochinolony. Jeżeli weźmiemy pod uwagę fakt, że kampylobakterioza jest jedną z najczęściej zgłaszanych w Unii Europejskiej chorób przenoszonych

drogą pokarmową, taka informacja byłaby dopełnieniem charakterystyki *Campylobacter jejuni* i roli tych bakterii we współczesnej medycynie.

W dalszej części rozdziału zdefiniowano ogólne pojęcie biofilmu bakteryjnego. Doktorant przedstawił również aktualną wiedzę na temat biofilmu tworzonoego przez *C. jejuni*. Opisana została rola jaką pełnią w procesie rozwoju biofilmu *C. jejuni* geny determinujące ruchliwość komórek bakteryjnych, geny odpowiedzialne za chemotaksję, białka błonowe oraz mechanizmy regulujące odpowiedź na stres środowiskowy. Jednocześnie Autor podkreślił, że w tym zakresie wciąż jeszcze brakuje dostatecznej wiedzy. Na zakończenie rozdziału Doktorant opisał metodę losowej mutagenyzy jako narzędzia umożliwiającego śledzenie funkcji genów oraz opisał trzy główne klasy transpozonów prokariotycznych. Podkreślono tu kluczową rolę losowej mutagenyzy bakterii w badaniach nad genomem *C. jejuni*.

Wstęp do pracy doktorskiej jest oparty o bogate piśmiennictwo z okresu 1963-2023 co stanowi dowód na odpowiednie, teoretyczne przygotowanie Doktoranta i wystarczające wprowadzenie do realizacji planu badawczego.

Doktorant zaprojektował szeroki wachlarz badań, które posłużyły mu do opisanie i zrozumienia tworzenia biofilmu *C. jejuni* i roli w tym procesie genów *cydB* i *hydC*. Szczegółowe cele jakie postawiono w pracy to:

- a) identyfikacja nowych genów biorących udział w tworzeniu biofilmu *C. jejuni* przeprowadzona z wykorzystaniem losowej mutagenyzy za pomocą transpozonu,
- b) skonstruowanie mutantów delecyjnych, a następnie ich komplementacja
- c) i ocena / charakterystyka biofilmu tworzonoego przez uzyskane mutanty.

W rozdziale Materiały i Metody, który liczy 31 stron, Doktorant scharakteryzował materiał badawczy, tj. szczepy bakteryjne *C. jejuni* i *E. coli* oraz plazmidy. Osiem z dziesięciu plazmidów otrzymano w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Materiał biologiczny oraz wykazy użytych w badaniach odczynników chemicznych, enzymów, środków przeciwdrobnoustrojowych, gotowych zestawów odczynników i podłoży mikrobiologicznych, zostały przedstawione w uporządkowany sposób w tabelach. Podobnie opisano w tabelach oligonukleotydy, aparaturę badawczą oraz wykorzystane w pracy oprogramowanie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wszystkie startery zostały samodzielnie zaprojektowane przez Doktoranta.

W drugiej części tego rozdziału przedstawiono w sposób szczegółowy zastosowane metody i techniki badawcze. To bardzo obszerna część i warto w tym miejscu przytoczyć badania wykonane przez Doktoranta: przygotowanie komórek elektrokompetentnych *C. jejuni*, losowa mutagenyza za pomocą transpozonu, hodowla biofilmu, identyfikacja genów przerwanych przez transpozon, skonstruowanie mutantów delecyjnych, komplementacja otrzymanych mutantów, colony PCR, izolacja plazmidów i ich sekwencjonowanie, a następnie badanie zdolności uzyskanych mutantów do tworzenia biofilmu i na koniec mikroskopowa analiza uzyskanego biofilmu w warunkach statycznych i w mikroprzepływie.

Na tym etapie oceny, odnosząc się tylko do części technicznej pracy należy wyraźnie podkreślić, że Doktorant opanował bogaty i zróżnicowany warsztat badawczy, na który składa się umiejętność prowadzenia hodowli bakterii wybrednych w ich formach planktonicznej i osiadłej, badania genetyczne oraz analiza mikroskopowa biofilmu (SEM, CLSM, BioFlux1000). Moje zastrzeżenie budzi jednak zastosowanie barwienia fioletem krystalicznym do ilościowej i jakościowej oceny wytworzonego biofilmu. Wprawdzie jest to metoda wciąż stosowana przez niektórych badaczy ale równocześnie coraz częściej kwestionowana. Wynika to z niemiernodajnych odczytów wskutek strat biomasy na etapie

eliminacji form planktonicznych. Proszę zatem Doktoranta o ustosunkowanie się w kwestii wyboru tej techniki.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów to rozdział liczący 13 stron, w którym obok treści zamieszczono 9 rycin i 1 tabelę. Po wykonaniu losowej mutagenезы dzikiego szczepu *Campylobacter jejuni* 81-176 za pomocą transpozonu EZ-Tn5, Doktorant uzyskał 350 mutantów, dla których wykonano ilościową ocenę wytwarzanego biofilmu. U 20 z 350 badanych szczepów wykryto obniżoną produkcję biofilmu. Ponieważ celem pracy była identyfikacja nowych genów mających znaczenie w tworzeniu tej struktury, odrzucono te mutanty u których transpozon został włączony w już znane geny. Ten etap pracy pozwolił Doktorantowi wyłonić dwa szczepy z genami, których znaczenie w tworzeniu biofilmu *C. jejuni* nie zostało jak dotąd opisane. Dotyczy to mutantu z genem *cydB* (kodujący oksydazę cytochromowo-ubichinolową) i mutantu z genem *hydC* (kodujący podjednostkę cytochromu b). W celu określenia roli tych genów w rozwoju biofilmu skonstruowano mutanty delecyjne i mutanty po komplementacji i ponownie dokonano oceny poziomu wytwarzanego biofilmu. Jak wykazał Autor, w porównaniu do szczepu dzikiego delecja badanych genów spowodowała spadek ilości wytworzonej biomasy, odpowiednio ~2,5x u mutantu  $\Delta cydB$  i ~1,6x u mutantu  $\Delta hydC$ . Po ponownym wprowadzeniu kopii odpowiedniego genu do mutantów delecyjnych, poziom wytwarzanego biofilmu wracał do tego, jaki obserwowano u szczepu dzikiego.

Ocena ilości wytworzonego biofilmu, który badano jednakową metodą w dwóch doświadczeniach (u 350 mutantów, a następnie u mutantów  $\Delta cydB$ ,  $\Delta hydC$ , comp-*cydB*, comp-*hydC*), była wykonywana w odniesieniu do tego samego, dzikiego szczepu *C. jejuni* 81-176. Jednak szczep ten w obu badaniach wykazywał znacznie różniący się poziom wytworzonej biomasy (OD<sub>570</sub> 1 na Ryc. 6 i OD<sub>570</sub> 0,48 na Ryc. 8).

Nasuwa się zatem pytanie czy ów „punkt odniesienia” nie powinien prezentować takich samych lub bardzo zbliżonych wartości? Jakie parametry doświadczenia zdaniem Doktoranta, mogły wpłynąć na te rozbieżności? Czy niedoskonałość metody badawczej (CV), jak wcześniej sugerowałam, mogła o tym zdecydować?

W dalszej części Doktorant wykonał badania struktury biofilmu, jego żywotności i dynamiki rozwoju, za pomocą mikroskopii. Obrazy uzyskane w SEM dowiodły, że mutanty delecyjne  $\Delta cydB$ ,  $\Delta hydC$  *C. jejuni* tworzą struktury biofilmu różniące się od tych obserwowanych u szczepu dzikiego i mutantów po komplementacji. Analiza żywotności biofilmów wykonana za pomocą CLSM wykazała, że odsetki komórek żywych i martwych w biofilmach mutantów  $\Delta cydB$ ,  $\Delta hydC$  oraz comp-*cydB*, comp-*hydC*), były zbliżone ale odmienne od szczepu dzikiego *C. jejuni*.

Czym można tłumaczyć prawie 2x wyższy odsetek martwych komórek w biofilmie szczepu dzikiego, w porównaniu do mutantów?

Mikroskopia konfokalna dostarczyła również dowodów na związek badanych genów ze zmniejszoną adhezją i kolonizacją powierzchni. Na uwagę zasługuje ostatni etap pracy, na którym Doktorant zastosował system BioFlux1000 do oceny tworzenia biofilmu i udziału w tym procesie genów *cydB* i *hydC*. To cenne badanie, w którym analizy wykonywane są w warunkach zbliżonych do naturalnych (w mikroprzepływie). Badanie to odzwierciedla w czasie, prawdopodobny przebieg powstawania biofilmu *C. jejuni*, jaki może mieć miejsce w organizmie gospodarza. Tu ponownie stwierdzono związek genów *cydB* i *hydC* z tworzeniem biofilmu *C. jejuni*. Ich brak u mutantów delecyjnych znacząco obniżał dynamikę rozwoju biofilmu. Delecja badanych genów skutkowała zmniejszeniem adhezji i kolonizacji powierzchni przez badane mutanty. Co ciekawe, u mutantów po komplementacji następował powrót do formowania biofilmu jednak w porównaniu do szczepu dzikiego, dopiero w 14-tej

(u mutantu *comp-hydC*) i 26-ej (u mutantu *comp-cydB*) godzinie prowadzenia eksperymentu. W rozdziale Dyskusja Doktorant wyjaśnił prawdopodobną przyczynę tej opóźnionej transformacji w formę osiadłą.

W Dyskusji zostało przypomniane znaczenie *C. jejuni* w patologii człowieka. Autor tłumaczy też dlaczego biofilmy tworzone przez drobnoustroje to ważne zagadnienie medyczne w odniesieniu do cech tej struktury, powodowanych zakażeń i związanych z nimi problemów terapeutycznych. To cenna uwaga, która wyjaśnia konieczność prowadzenia badań nad mechanizmami warunkującymi tworzenie każdego biofilmu. Jednak to ciekawe wprowadzenie do dyskusji zaburza nieco kwestie dotyczące biofilmów *E. coli* i *P. aeruginosa*, które są powtórzeniem treści prezentowanych we Wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej.

W części dotyczącej charakterystyki biofilmu tworzonego przez mutanty delecyjne pada stwierdzenie, że mutant  $\Delta hydC$  tworzył biofilm z przewagą komórek kokoidalnych, czego nie odnotowano dla mutantu  $\Delta cydB$ . Czym zdaniem Doktoranta można tłumaczyć dominację tych komórek tylko u jednego z mutantów?

Opis dynamiki tworzenia biofilmu jaki stworzono na podstawie badań w mikroprzepływie zawiera moim zdaniem nieścisłość. Autor wskazał bowiem, że tylko mutant *comp-cydB* tworzył biofilm z opóźnieniem w stosunku do szczepu dzikiego. Jednak jak pokazują wyniki badań (Ryc. 12) oba mutanty wykazywały to „opóźnienie” choć należy się zgodzić, że różne w czasie.

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych przez Doktoranta pozwoliły mu na sformułowanie ostatecznych wniosków co do znaczenia genów *cydB* i *hydC*. Geny te zostały określone jako pełniące istotne funkcje w procesie tworzenia biofilmu przez *Campylobacter jejuni*. Dodatkowo wskazano, że zastosowana technologia EZ-Tn5 jest skutecznym narzędziem do badania mechanizmów warunkujących proces tworzenia biofilmu przez te bakterie.

## Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska posiada moim zdaniem wysoką wartość naukową. Dyskusja dotycząca uzyskanych wyników daje jasny pogląd na znaczenie prowadzonych badań. W warstwie technicznej pracy doktorskiej, co ponownie chcę zaznaczyć, mgr J. Korkus zaprezentował umiejętność przygotowania i posługiwania się bogatym i zróżnicowanym warsztatem badawczym, od technik biologii molekularnej do analizy z wykorzystaniem nowoczesnej mikroskopii. Dostarczenie odpowiedzi na pytania dotyczące funkcji genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni* uważam za znaczący wkład w rozwój mikrobiologii biofilmu medycznego oraz ważne osiągnięcie naukowe Doktoranta.

## Uwagi dodatkowe

Recenzowaną rozprawę oceniam pozytywnie pod względem językowym i formalnym. Pracę charakteryzuje ład edytorski i odpowiednia szata graficzna. Moje dodatkowe, drobne uwagi są następujące:

a) w pracy mają miejsce braki w zakresie korelacji cytowania i odnośnika w bibliografii. W większości dotyczy to nieprawidłowej daty publikacji. Błędne informacje pojawiają się m. in. na stronach: 15 (w spisie poz. 52), 17 (poz. 59), 22 (poz. 25, 71), 23 (brak pozycji z 2015r), 72 (poz. 16 i 127).

b) Określenie „system przepływu mikroprzepływowego BioFlux 1000” należałoby zastąpić określeniem „system kontrolowanego mikroprzepływu BioFlux 1000”.

## Ocena końcowa

Rozwiązanie problemu badawczego zostało wykonane na wysokim poziomie merytorycznym. Doktorant opanował umiejętność projektowania i prowadzenia złożonych eksperymentów naukowych. Jednocześnie, wykazał się on zdolnością do analizy danych za pomocą nowoczesnych narzędzi analitycznych. Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Korkusa, pt.: **Rola genów *cydB* i *hydC* w procesie tworzenia biofilmu *Campylobacter jejuni***, zrealizowana pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Wałęckiej-Zacharskiej, prof. UPWr, potwierdza przygotowanie i ogólną wiedzę Doktoranta w zakresie dyscypliny Weterynaria.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe kryteria określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. z 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, o dopuszczenie mgr. Jakuba Korkusa do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej i ważną problematykę badawczą, **wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Jakuba Korkusa.**

Wrocław 2.09.2024r

Dr hab. Ewa Dworniczek

