

Warszawa, 12.08.2024

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Miskiewicz

Pani mgr Joanna Miskiewicz, absolwentka Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego przedstawiła do oceny rozprawę doktorską pod tytułem „Poszukiwanie nowych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach”, wykonaną na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego, pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Trylskiej i zmarłego prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza.

Część merytoryczna rozprawy, licząca 139 stron, rozpoczyna się od streszczeń w językach polskim i angielskim oraz wyliczenia grantów współfinansujących badania przedstawione w rozprawie, w tym własnego grantu Preludium Autorki, a także listy publikacji i wystąpień konferencyjnych. Część wstępna rozprawy została ujęta w trzech pierwszych rozdziałach: („Wprowadzenie, Metody doświadczalne biofizyki i biologii molekularnej, Metody statystyczne). Następnie Doktorantka przedstawia wyniki swoich badań w trzech częściach, zatytułowanych „Przeciwbakteryjna aktywność rybozemu hammerhead”, „Przeciwbakteryjne działanie peptydów i peptydomimetyków” oraz „Transport koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z witaminą B12 lub peptydem (KFF)3K do komórek Escherichia coli”. Każda z tych części obejmuje klasyczne sekcje pracy naukowej: wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja i podsumowanie. Rozprawę wieńczy krótkie podsumowanie całości i bibliografia, licząca 259 pozycji. Rozdział „Wprowadzenie” w istocie stanowi opis celu pracy z uzasadnieniem. To niekonwencjonalne podejście do układu rozprawy jest jednak jak najbardziej na miejscu, gdyż Autorka potrafiła zarysować ogólny cel swoich badań, czyli zmierzenie się z problemem lekooporności bakterii, w sposób przekonujący, acz bardzo zwięzły. W tym miejscu muszę sprostować podaną przez Autorkę nieprawdziwą, choć rozpowszechnioną informację, jakoby Alexander Fleming wyizolował penicylinę w r. 1928, podczas gdy w rzeczywistości dokonał tego Howard Florey wraz z Ernestem Chainem dekadę później.

W dalszym ciągu tego rozdziału Doktorantka omawia trzy strategie zwalczania lekooporności, które eksplorowała podczas prac nad rozprawą doktorską, a mianowicie bakteriobójcze zastosowanie rybozemu przez niszczenie wybranej cząsteczki mRNA, zwiększenie aktywności peptydomimetyków przez stabilizację ich aktywnej konformacji oraz utworzenie koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) z witaminą B₁₂ dla wprowadzania ich do komórki bakteryjnej i dezaktywację wybranej cząsteczki mRNA. Wszystkie trzy podejścia są bardzo nowoczesne i obiecujące jako metody obchodzenia znanych mechanizmów lekooporności. Ich założenia zostały przedstawione w bardzo przystępnej formie tabelarycznej i rozwinięte w podziale na poszczególne zadania badawcze.

Kolejny rozdział rozprawy jest poświęcony omówieniu stosowanych przez Doktorantkę metod doświadczalnych biofizyki i biologii molekularnej, kolejno kalorymetrii ITC, elektroforezy żelowej, spektroskopii UV-vis wraz z pomiarem temperatury topnienia, spektroskopii fluorescencyjnej, a następnie metody PCR, klonowania molekularnego, transformacji wektorowej metodą szoku cieplnego, RT-qPCR, wyznaczania wartości MIC i redukcyjnego testu resazuryny, służącego ocenie żywotności komórek. Metody te są opisane poprawnie, czytelnie, a opisy są bardzo dobrze zilustrowane. Nie mam najmniejszych zastrzeżeń do tej części rozprawy. Równie klarowny jest opis zastosowanych metod statystycznych, będący przedmiotem kolejnego rozdziału.

Rozdziały 4-6 przedstawiają autonomiczne opisy trzech projektów badawczych, składających się na rozprawę. Należy je więc omówić osobno.

Rozdział 4 Autorka rozpoczyna od przedstawienia zagrożeń zdrowotnych, powodowanych przez bakterie jelitowe *Escherichia coli*, po czym zwięźle opisuje kwasy nukleinowe, by obszerniej przedstawić rybozemy, ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowań terapeutycznych. Opis ten jest drobiazgowy i wyczerpujący. Doktorantka zwraca szczególną uwagę na rybozemy typu hammerhead, jako najprostsze i najlepiej przebadane w zastosowaniach medycznych. W zasadzie jedyna uwaga krytyczna, którą mogę sformułować dla tej części rozprawy, dotyczy terminu „konserwatywny” w odniesieniu do rdzenia rybozemu hammerhead. Raczej jednak „konserwowany”. Szczególnie ważny jest podrozdział 4.1.9, poświęcony rozważeniu silnych i słabych stron rybozymów w zastosowaniach przeciwbakteryjnych, zwłaszcza że opisane uprzednio próby ich zastosowania w leczeniu innych chorób nie napawają szczególnym optymizmem. Podrozdział ten świadczy o bardzo dobrym rozeznaniu Doktorantki w szerszym kontekście realizowanego przez nią projektu. Rozważane są też trzy różne cele bakteriobójcze dla rybozemu w *E. coli*. Na końcu części wstępnej rozdziału 4 przedstawiono zasadę działania i zastosowanie operonu *lac*. Następnie Autorka przedstawia aspekty metodologiczne swoich badań w sekcji

Materiały i Metody. Opis ten pozwala na stwierdzenie poprawności przeprowadzenia wszystkich eksperymentów.

Wyniki badań wiązania i cięcia substratów dla dwóch wariantów rybozymu, opracowanych na podstawie analizy sekwencji trzech wybranych cząsteczek mRNA uznanych za kluczowe dla zahamowania procesów życiowych bakterii są bardzo ciekawe. Opis wyników miareczkowań kalorymetrycznych nie budzi wątpliwości, drobne różnice stałych wiązania między sekwencjami są oczekiwane i oczywiście rybozym długi tworzy większą liczbę wiązań z substratem, co skutkuje wyższą stałą powinowactwa. Natomiast porównując wyniki ITC z opisem kinetyki cięcia substratów można stwierdzić, że w przypadku mRNA_{acpP} hydroliza substratu powinno zachodzić w trakcie eksperymentu ITC. Jednak zjawisko to nie wydaje się odzwierciedlać w wartościach parametrów termodynamicznych, a jedynie zmierzone stałe wiązania są niższe dla tego substratu. Chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do tego zagadnienia. Przy okazji, podpisy pod rysunkami 26, 27 i 28 są takie same i zbyt ogólne, ale jak rozumiem jest to przeoczenie na poziomie edycji tekstu.

Badania aktywności rybozymów, wprowadzonych do bakterii *E. coli* zostały przeprowadzone i zanalizowane bardzo wnikliwie. Zgadzam się z ogólnym wnioskiem, płynącym z tych badań, że rybozomy mogłyby zostać zastosowane jako czynniki bakteriobójcze. Natomiast silna zależność aktywności od rodzaju pożywki hodowlanej pociąga za sobą pytanie, czy to konkretne podejście, które zostało tu zastosowane, w ogóle będzie działać w kontekście organizmu człowieka, lub zwierzęcia. Chciałbym prosić o zwięzłe przedyskutowanie tego zagadnienia podczas obrony. Ponadto chciałbym zapytać o aspekt ilościowy terapii – np. jaki nadmiar cząsteczek plazmidu należy zastosować, by uzyskać np. 99% skuteczność bakteriobójczą i jak wygląda aspekt czasowy tej aktywności. W dyskusji rozdziału 4, skądinąd wnikliwej i świadczącej o bardzo dobrej znajomości przedmiotu przez Doktorantkę, nie ujęto tych kwestii. Pomocnym tropem może być wspomniana przez nią różnica częstości podziału *E. coli* między warunkami laboratoryjnymi i środowiskiem jelita.

Rozdział 5 dotyczy zastosowania bakteriobójczego peptydów i ich modyfikowanych analogów o ustabilizowanej strukturze helikalnej. Autorka wybrała trzy krótkie peptydy o znanej z literatury aktywności biobójczej, polegającej na zaburzeniu struktury błony komórkowej: anoplinę, W-MreB₁₋₉ oraz (KFF)₃K. Wstęp do tej części rozprawy jest bardzo zwięzły, może nazbyt zwięzły w stosunku do znacznej różnorodności sekwencyjnej peptydów przeciwbakteryjnych (AMP), opisanie której pomogłoby w zrozumieniu przyczyn, dla których do badań wybrano akurat te trzy 10-peptydy. Pomijając tę kwestię, wstęp jest wystarczający dla prześledzenia ich aktywności,

badanej przez Doktorantkę. Z drugiej strony, dane literaturowe, pasujące według mnie do części wstępnej, zostały omówione jako element dyskusji, na str. 102-103.

Zakres wykonanych eksperymentów bakteriologicznych jest spory, dając podstawę dla rzetelnej oceny potencjału rozwoju badanych sekwencji. Dzięki temu Autorka mogła już w tej fazie badań wyeliminować peptyd W-MreB₁₋₉, jako bardzo mało aktywny. Podane przez nią w dyskusji uzasadnienie rozbieżności tego wyniku z literaturowymi, czyli zastosowanie innego medium, jest przekonujące. Aktywacja antybiotyku przez bufor fosforanowy (lub dezaktywacja przez medium hodowlane) to bardzo ciekawe zagadnienie, ale oczywiście wykracza ono za ramy omawianej rozprawy. Podobne efekty, choć mniej skrajne, obserwowane są również dla anopliny, co również opisano w dyskusji. Autorka zauważa, że niezbyt duża aktywność pozostałych peptydów pozwoli na łatwiejsze ustalenie efektów modyfikacji. Jest to prawda z punktu widzenia technologii pomiarów, ale w sumie niska aktywność prekursora zazwyczaj nie jest dobrym prognostykiem dla skuteczności cząsteczek modyfikowanych.

Wyniki dla spiętych analogów anopliny jasno wskazują, że (i) spięcie anopliny, zwłaszcza w pozycji 2-6, jest korzystne dla jej działania wobec bakterii Gram-ujemnych, ale osiągnięta aktywność jest o rząd wielkości słabsza, niż dla polimyksyny B. Natomiast skuteczność wobec bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza *S. aureus* ATCC BAA1720 MRSA anopliny spiętej w pozycji 5-9 jest znaczna w stosunku do testowanych antybiotyków. Są to wyniki obiecujące dla dalszych badań, gdyż potwierdzają one sens stabilizacji struktury helikalnej dla tego peptydu. Dyskusja zależności między strukturą i aktywnością dla tego peptydu jest napisana w sposób rozsądny, choć nieuchronnie ma charakter hipotetyczny przy braku konkretnych badań strukturalnych. Te zaś byłyby uzasadnione przy wyższej aktywności analogów, są zatem kwestią przyszłości (myślę, że niedługo, o ile laboratorium będzie kontynuować badania anopliny). *Nota bene* w tekście zauważyłem pewne wahanie, jak gdyby pierwotnie Autorka użyła nazwy angielskiej anoplin, a potem zdecydowała się ją spolszczyć, pisząc anoplina, ale jednak nie wszędzie.

Czytając opis eksperymentów wykonanych przez Doktorantkę odniosłem wrażenie, że peptyd (KFF)₃K jest w rozprawie potraktowany jakoś tak po macoszemu, raczej jako cząsteczka kontrolna niż obiekt istotnych badań. Na str. 93 znajduje się uwaga o wybraniu tego peptydu, obok anopliny, do badań nad zszywaniem, z jednoczesnym stwierdzeniem, że przedstawione zostaną tylko wyniki dla anopliny. Częściowe wyjaśnienie tego stanu rzeczy znalazłem w dyskusji, gdzie Doktorantka opisuje wyniki uzyskane w jej grupie badawczej dla spiętych analogów (KFF)₃K jako dane literaturowe (pozycja 191). Jednocześnie jest Ona współautorką tego artykułu. Chciałbym prosić o wyjaśnienie tej niespójności.

Ostatnia część wyników, zawarta w rozdziale 6, dotyczy wprowadzania do komórek bakterii cząsteczek PNA, o sekwencjach komplementarnych z wybranymi cząsteczkami mRNA, dla hamowania biosyntezy odnośnych białek. Dla umożliwienia transportu zastosowano koniugację PNA z wspomnianym powyżej peptydem (KFF)₃K lub kobalamina. Oba te podejścia znane są z literatury, natomiast oryginalnym wkładem jest dostarczanie fragmentu mRNA genu *mrfp1*, białka czerwonej fluorescencji. Autorka zmodyfikowała bakterie *E. coli* za pomocą skonstruowanego przez siebie plazmidu tak, by eksprymowały one to białko i fluoryzowały. Dzięki temu skuteczne wprowadzenie PNA do komórki można było oceniać ilościowo, mierząc fluorescencję hodowli bakteryjnych. Do badań zastosowano również, jako kontrole, szczepy *E. coli* pozbawione receptorów odpowiedzialnych za transport za pośrednictwem (KFF)₃K i kobalaminy. Doktorantka przeprowadziła również badania kontrolne *in vitro* badanych oddziaływań, za pomocą pomiarów krzywych topnienia spodziewanych dupleksów. Wyniki uzyskane w tej części rozprawy są spójne i zgodne z oczekiwaniami – silniejsze hamowanie fluorescencji zaobserwowano dla trwalszych dupleksów, a wchłanianie koniugatów PNA z nośnikami było możliwe tylko przy zachowaniu przez bakterie białek odpowiedzialnych za pobieranie tych nośników. Doktorantka sugeruje w dyskusji, że kobalamina może być odpowiednim nośnikiem dla wprowadzania bakteriobójczych cząsteczek PNA lub kwasów nukleinowych. W tym kontekście chciałbym prosić o ustosunkowanie się do mojej obawy, że drobne mutacje w którymkolwiek z białek uczestniczących w transporcie kobalaminy, które upośledzałyby transport koniugatów bardziej niż samej witaminy B₁₂, stanowiłyby niebezpieczny mechanizm nabywania oporności na takie antybiotyki.

Rozprawę wieńczy zbiorcze podsumowanie, w którym Autorka stwierdza, że cele jej badań zostały osiągnięte. Nie pozostaje mi nic innego, niż zgodzić się z tym stwierdzeniem. Eksperymenty przedstawione w rozprawie wykazały istnienie potencjału bakteriobójczego dla każdego z trzech zastosowanych podejść. Rozprawa jest napisana bardzo dobrym językiem, świadczącym o dużym zaangażowaniu Doktorantki w przedstawione badania. Układ rozprawy, choć niestandardowy, jest przejrzysty, a strona ilustracyjna stoi na bardzo wysokim poziomie. Znaczna część wyników została opublikowana w artykułach naukowych w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych, co dodatkowo potwierdza ich ważkość.

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że przedłożona do oceny praca p. mgr Joanny Miskiewicz spełnia wymogi ustawowe, stawiane przed rozprawami doktorskimi i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na nowatorskie ujęcie problemu, ogromny wkład pracy Doktorantki, szeroką gamę zastosowanych przez nią metod badawczych biofizyki, biologii

molekularnej i bakteriologii, liczne oryginalne wyniki badawcze i perspektywę ich twórczej kontynuacji wnoszą również o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.

W. Bzd