



KATEDRA
BIOFIZYKI

Lublin, 11 sierpnia 2024 r.

Dr hab. Rafał Luchowski, prof. UMCS

Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Joanny Miszkiewicz pt. „Poszukiwanie nowych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach”

Zagrożenia bakteryjne stanowią poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, ze względu na rosnącą odporność bakterii na antybiotyki, co w efekcie utrudnia leczenie infekcji. Niektóre szczepy są wyjątkowo odporne na dostępne leki, co prowadzi do wydłużonych hospitalizacji, wyższej śmiertelności i zwiększonych kosztów opieki zdrowotnej. Zgodnie z danymi Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC), szacuje się, że rocznie infekcje odporne na antybiotyki powodują około 25 000 zgonów w Europie i generują koszty związane z opieką zdrowotną w wysokości 1,5 miliarda euro. W obliczu tych zagrożeń kluczowe jest wdrażanie skutecznych strategii prewencyjnych, takich jak szczepienia, monitorowanie zakażeń i edukacja społeczeństwa w zakresie zapobiegania infekcjom bakteryjnym, a także rozwijanie nowych terapii.

Cykl badań przeprowadzonych przez panią mgr Joannę Miszkiewicz oraz zaprezentowanych w ramach Jej rozprawy doktorskiej jest ściśle związany z tym właśnie obszarem naukowym. Jej praca miała na celu zbadanie możliwości wykorzystania kwasów nukleinowych i peptydomimetyków jako potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych. W rozprawie zaprezentowano trzy takie podejścia, które - w zależności od zastosowanej procedury- hamowały wzrost bakterii lub umożliwiały transport cząsteczek do wnętrza komórek mikroorganizmów. Ze względu na duży potencjał aplikacyjny badań, uważam, że praca Doktorantki jest niezwykle ważna.

Praca doktorska została zrealizowana w Centrum Nowych Technologii oraz na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem śp. prof. dra hab. Edwarda Darżynkiewicza oraz prof. dr hab. Joanny Trylskiej. Zespół prof. Trylskiej jest jednym z czołowych w kraju, który od lat odnosi znaczące sukcesy w projektowaniu innowacyjnych związków przeciwbakteryjnych oraz badaniu białek kluczowych dla wirusów zapalenia wątroby i HIV, wykorzystując techniki doświadczalne oraz modelowanie molekularne. Doktorantka zdobywała więc doświadczenie badawcze pod kierunkiem znakomitych specjalistów, uczestnicząc w licznych projektach finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, Fundację na Rzecz Nauki Polskiej oraz instytucje wewnętrzne (OPUS 2020/37/B/NZ1/02904, SONATA 2019/35/D/NZ1/01957, PRELUDIUM 2017/27/N/NZ1/00986, MINIATURA 2019/03/X/NZ1/00077, INTER 33/UD/SKILLS/2015). Co warto podkreślić, kierowała również własnymi projektami (PRELUDIUM 2020/37/N/NZ1/03987 oraz grantem obliczeniowym nr GB74-7). Badania naukowe Pani magister obejmowały syntezę chemiczną oraz zastosowanie technik absorpcji światła, fluorescencji i elektroforezy. Rezultaty wysiłków badawczych opublikowane zostały w pięciu wieloautorskich publikacjach naukowych, które ukazały się w latach 2019-2023, a dwie dodatkowe prace pozostają obecnie na etapie recenzji oraz przygotowania manuskryptu. Publikacje Doktorantki cechują się wysokim poziomem wskaźników oddziaływania tzw. *impact factor*. *The Journal of Physical Chemistry B* (IF 2,857), *Molecules* (IF 4,411), *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5,923), *Frontiers*

in *Microbiology* (IF 6,064) i *Scientific Reports* (IF 3,8) - indeksowane odpowiednio dla różnych lat przyjęcia ich do druku. W żadnej z opublikowanych prac Doktorantka nie występuje jako pierwszy autor, ale podjęta współpraca ukazuje Jej gotowość do nawiązywania naukowych partnerstw, mających na celu osiągnięcie wyznaczonych sobie celów badawczych. Należy przy tym zaznaczyć, że pani Miszkiewicz posiada w swoim dorobku również dwie niewspomniane wcześniej publikacje dotyczące badań realizowanych poza ramami pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Miszkiewicz liczy 139 stron i została podzielona na części, w mojej opinii, w bardzo interesujący i przystępny dla czytelnika sposób. Tradycyjnie składa się z części literaturowej i doświadczalnej, jednak każda z trzech części doświadczalnych, które dotyczą różnych strategii antybakteryjnych, zawiera również przegląd literatury (odnoszący się do badań światowych), wyniki, dyskusję oraz podsumowanie.

Praca rozpoczyna się rozdziałem zawierającym streszczenie w języku polskim i angielskim, zgodne z wymogami formalnymi. Następnie wymieniono udziały w projektach naukowych, publikacje oraz prezentacje wyników na konferencjach naukowych. Kolejne części obejmują spis treści oraz rozdział *Wprowadzenie*, który precyzyjnie określa główny cel pracy oraz cele poboczne, a także wprowadza do biofizycznych metod badawczych zastosowanych w rozprawie. Moim zdaniem, najciekawsze rozdziały pracy doktorskiej dotyczą wyników i dyskusji. Należy przy tym podkreślić, że część badań musiała być prowadzona w okresie pandemii, co - jak przypuszczam - mogło znacznie utrudnić pełną realizację założonych sobie ambitnych planów i celów pracy doktorskiej.

W pierwszej części badań przeanalizowano potencjał rybozymów typu *hammerhead* do cięcia mRNA kluczowych genów bakterii *in vitro* i *in vivo*. Zaprojektowano rybozimy o różnej długości ramion i zbadano ich zdolność do przecinania specyficznych sekwencji mRNA. Wyniki pokazały, że efektywność rybozimu zależy nie tylko od sekwencji rdzenia katalitycznego, ale także

od dopasowania do miejsca cięcia oraz długości ramion, które tworzą kompleks z substratem. Eksperymenty *in vitro* wykazały, że rybozym z krótszymi ramionami skutecznie przecina trójkę nukleotydów GUA w mRNA genów bakteryjnych. Jednak w warunkach *in vivo*, bardziej efektywny okazał się rybozym z dłuższymi ramionami, co sugeruje, że rybozomy muszą być odpowiednio stabilizowane w komórkach bakteryjnych, aby zachować swoją aktywność. Ukrycie rybozimu w strukturze tRNA nie zwiększyło wydajności cięcia, ale zauważono zahamowanie wzrostu bakterii, co może wynikać z kilku współistniejących czynników, takich jak blokowanie translacji mRNA czy obciążenie komórek plazmidami. W tej części pracy wskazano na znaczenie dalszych badań nad metodami dostarczania rybozymów do komórek oraz ochroną rybozymów przed degradacją przez nukleazy. Zwrócono uwagę na potencjał rybozymów do współdziałania z antybiotykami, co mogłoby prowadzić do zmniejszenia dawek leków i redukcji ich efektów ubocznych.

W drugiej części badań skoncentrowano się na peptydach kationowych (anoplina, W-MreB₁₋₉, (KFF)₃K) o zbliżonej hydrofobowości i ich słabej aktywności przeciwbakteryjnej. Zastosowanie modyfikacji strukturalnych, takich jak „zszywanie” peptydów, zwiększyło ich helikalność i stabilność, co poprawiło odporność na enzymy proteolityczne oraz aktywność przeciwbakteryjną. Tutaj, szczególnie skuteczny okazał się „zszyty” analog anopliny w pozycjach 2-6 z zamkniętym pierścieniem stabilizującym strukturę helikalną peptydu, który wykazywał niską wartość MIC dla wielu szczepów Gram-ujemnych i brak hemolizy. Wprowadzenie „zszywek” do peptydów (KFF)₃K i anopliny poprawiło ich stabilność i aktywność przeciwbakteryjną, jednocześnie zmniejszając podatność na degradację enzymatyczną i hemolizę. Wyniki wskazują, że technika „zszywania” może poszerzyć możliwości projektowania nowych peptydomimetyków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

W ostatniej części badań oceniono efektywność koniugatów PNA oraz peptydów w wyciszaniu fluorescencji RFP w bakteriach. W badaniach oceniono, jak

różne koniugaty PNA oraz peptydy wpływają na fluorescencję RFP w bakteriach. Okazało się, że wolne cząsteczki PNA i peptyd (KFF)₃K w zastosowanych przez Doktorantkę stężeniach nie wpływały na fluorescencję, chyba że stężenia te powodowały zahamowanie wzrostu bakterii. Najważniejsze w mojej opinii wyniki pokazały, że koniugaty z PNA_{anty-rfp} znacznie wygaszały fluorescencję RFP, ponieważ PNA_{anty-rfp} dobrze pasuje do fragmentu RNA. Koniugaty (KFF)₃K-PNA_{scrambled} działały około 50% słabiej w tym zakresie. Potwierdzono to w badaniach na różnych szczepach *E. coli*, w tym mutantach z usuniętymi białkami transportującymi. W mutantach $\Delta sbmA$, które nie mogą transportować peptydów, nie zaobserwowano wygaszania fluorescencji przez koniugaty z PNA_{anty-rfp}, co wskazuje na rolę białka błonowego SbmA w transporcie peptydów. Koniugaty PNA z witaminą B12 nie wpływały na fluorescencję w mutantach $\Delta btuC$, $\Delta btuD$ i $\Delta btuF$, co sugeruje, że białka te są kluczowe dla transportu witaminy B12 do komórki. Zaobserwowane różnice w wygaszaniu fluorescencji między koniugatami były związane z różną stabilnością ich kompleksów z RNA. Koniugaty z (KFF)₃K były bardziej stabilne, niż te z witaminą B12, co potwierdzało ich silniejsze oddziaływanie z RNA.

Z analizy pracy doktorskiej wynika, że omawiana tematyka, mimo dotychczasowych osiągnięć, nadal ma duży potencjał rozwojowy, a przyszłe badania mogą przynieść znaczące postępy.

Poziom edytorski rozprawy jest zadowalający. Mógłbym zaproponować jedynie kilka drobnych poprawek edytorskich oraz niepoprawnych stwierdzeń:

- Str. 22, niepoprawnie opisano parametr oznaczony we wzorach jako E , określając go najpierw jako natężenie pola elektrycznego, a dalej (na tej samej stronie) jako natężenie prądu;
- Str. 24, Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego jest proporcjonalna do kwadratu iloczynu skalarnego wektora elektrycznego światła oraz dipolowego momentu przejścia, a nie jak zapisano, do momentu dipolowego (moment dipolowy występuje jako operator);

- Str. 27, występuje nieprecyzyjne uproszczenie w postaci „ukośnych przejść elektronowych” na diagramie Jabłońskiego. Występują jedynie poziome (ISC) i pionowe (IC) przejścia elektronowe;
- Str. 43, jest zapisane wykorzystany, powinno być wykorzystany;
- Str. 81, W części *Dyskusja* powtórzenie „rybozym rybozym”;

Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczają niewątpliwie interesujących informacji, ale rodzą jednocześnie pytania, które pozwolę sobie sformułować poniżej:

1. W badaniach zaobserwowano zahamowanie wzrostu bakterii. Chciałbym dopytać, który z potencjalnych mechanizmów (np. cięcie mRNA, blokowanie translacji, obciążenie plazmidem) miał na to największy wpływ?
2. W jaki sposób specyficzne dopasowanie długości ramion rybozymu do sekwencji docelowej wpływa na jego efektywność w warunkach *in vivo*, biorąc pod uwagę potencjalne różnice w strukturze mRNA między warunkami *in vitro*, a rzeczywistym środowiskiem komórkowym?
3. Doktorantka, w swoich badaniach dotyczących modyfikacji peptydów poprzez wprowadzenie "zszywek" porównała swoje wyniki z wartościami MIC dostępnymi w literaturze. Czy warunki przeprowadzenia eksperymentów literaturowych i własnych również były analogiczne?
4. W jaki sposób można wykluczyć wpływ autofluorescencji komórek bakteryjnych na wyniki wygaszania fluorescencji RFP podczas inkubacji z koniugatami PNA?

Mam nadzieję, że powyższe pytania będą stanowiły podstawę do ciekawej dyskusji w trakcie publicznej obrony.

Podsumowując, chciałbym zaznaczyć, że w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej Doktorantka osiągnęła zamierzone cele, a analiza uzyskanych wyników jest merytorycznie trafna. Rozprawa doktorska opiera się na starannie zaplanowanych

i przeprowadzonych eksperymentach, które wymagały od Doktorantki sprawnego poruszania się w różnych podejściach badawczych.

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Joanny Miskiewicz spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Co więcej, zarówno wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań jak i waga uzyskanych wyników, które stanowią podstawę rozprawy, czyni ją, w moim odczuciu, godną wyróżnienia. Największym osiągnięciem tych badań jest skuteczne pokazanie, że rybozomy *hammerhead* mogą być używane do specyficznego cięcia mRNA bakterii, co skutkuje ich większą wrażliwością na antybiotyki. Różne modyfikacje peptydów antybakteryjnych, takie jak „zszywanie” struktur helikalnych, poprawiają ich stabilność i aktywność przeciwbakteryjną, a także zmniejszają ich hemolityczność. Badania nad koniugatami PNA wykazały, że dodatnie ładunki peptydów znacząco zwiększają ich efektywne wnikanie do komórki i oddziaływanie z RNA. Prace badawcze przeprowadzone przez panią Miskiewicz znacząco przyczyniają się do rozwoju nowych metod leczenia infekcji bakteryjnych poprzez precyzyjne celowanie i modyfikację peptydów oraz rybozymów.

W związku z powyższym, rekomenduję dopuszczenie mgr Joanny Miskiewicz do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk fizycznych.

Gratuluję Doktorantce oraz pani Promotor osiągnięcia cennych rezultatów.