

RECENZJA**rozprawy doktorskiej mgr Joanny Miskiewicz****pt. „Poszukiwanie nowych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych i peptydomimetykach”**

wykonanej na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego

pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Trylskiej oraz prof. dr hab. Edwarda Darżynkiewicza

Rozprawa mgr Joanny Miskiewicz dotyczy problemu narastającej oporności bakterii na antybiotyki, jednego z największych wyzwań współczesnej medycyny. Zakażenia wielolekooporne stanowią rosnące zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie, a ich skuteczne leczenie wymaga opracowania nowych strategii terapeutycznych. Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), oporność na antybiotyki już teraz prowadzi do ponad 1,3 miliona zgonów rocznie, a liczba ta stale rośnie. Szacuje się, że do 2050 roku liczba zgonów spowodowanych przez infekcje wywołane przez wielolekooporne szczepy bakterii może osiągnąć 10 milionów rocznie, co stanowiłoby większą liczbę ofiar niż w przypadku nowotworów. Główne szczepy bakterii, które stały się odporne na większość lub wszystkie dostępne antybiotyki, to między innymi *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, oraz *Mycobacterium tuberculosis*. Wzrastająca oporność bakterii na antybiotyki stanowi jeden z najpoważniejszych problemów zdrowia publicznego na całym świecie. W świetle tego narastającego problemu badacze poszukują nowych strategii terapeutycznych, które mogą obejmować między innymi peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP) oraz koniugaty peptydowe. Badania nad tymi związkami wykazują, że mają one zdolność do zwalczania opornych na antybiotyki bakterii, a jednocześnie nie wywołują odpowiedzi immunologicznej, są mniej cytotoksyczne i wykazują mniej typowe mechanizmy działania, co utrudnia rozwój oporności u bakterii. W nurt tych poszukiwań wpisuje się recenzowana praca doktorska Pani Joanny Miskiewicz. W rozprawie doktorskiej autorka koncentruje się na trzech innowacyjnych podejściach przeciwbakteryjnych: rybozymach, peptydomimetykach oraz wykorzystaniu peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) w koniugacji z witaminą B12. Tematyka badawcza wpisuje się w aktualne potrzeby badawcze związane z opornością bakteryjną, a proponowane przez mgr Miskiewicz podejścia stanowią nowe i obiecujące rozwiązania w tej dziedzinie.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Joanny Miskiewicz liczy 139 stron. Struktura pracy jest klasyczna, charakterystyczna dla rozpraw naukowych z dziedziny nauk ścisłych. Składa się z

głównych rozdziałów: Wprowadzenie, Cele pracy, Metody doświadczalne, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie oraz Bibliografia. Rozdział Wyniki został podzielony na trzy główne podrozdziały, które szczegółowo omawiają uzyskane wyniki badań: (i) Przeciwbakteryjna aktywność rybozymu hammerhead, (ii) Przeciwbakteryjne działanie peptydów i peptydomimetyków, (iii) Transport koniugatów peptydowych kwasów nukleinowych z witaminą B12 lub peptydem (KFF)3K do komórek Escherichia coli. Każdy z tych podrozdziałów zawiera własne omówienie doniesień literaturowych, opis materiałów i metod, wyniki oraz dyskusję i podsumowanie. Właściwie każdy z tych podrozdziałów mógłby stanowić osobną pracę doktorską, jednak są one logicznie powiązane z głównym tematem i wspólnie realizują jeden cel badawczy. Praca zawiera 258 odnośników literaturowych, z czego 98 (38%) pochodzi z ostatnich pięciu lat, co potwierdza aktualność przeprowadzonych badań. W bibliografii znajduje się także 7 publikacji autorstwa Pani Promotor, co świadczy o wpisaniu rozprawy w wieloletnie badania prowadzone przez zespół prof. Trylskiej. W pracy zamieszczono 98 rysunków i 20 tabel, które obrazują kluczowe wyniki badań w sposób graficzny. Rozprawa została napisana po polsku, poprawnie i zrozumiale, a jej edytorskie przygotowanie jest staranne. Zauważyłam jedynie drobne niedociągnięcia, takie jak słaba jakość niektórych rysunków. Pojedyncze błędy to powtórzenia wyrazów (np. „rybozym rybozym z krótkimi ramionami” na str. 81) oraz użycie nieformalnego żargonu laboratoryjnego (np. „zligowano” na str. 113). Te drobne uchybienia nie wpłynęły jednak na zrozumienie treści rozprawy, którą przeczytałam z dużym zainteresowaniem.

Podziękowania, które autorka zawarła w pracy, są szczególnym wyrazem uznania dla osób, które miały wpływ na jej rozwój naukowy i osobisty. Autorka wyraża wdzięczność m.in. swoim promotorom, prof. Joannie Trylskiej i śp. prof. Edwardowi Darżynkiewiczowi, za wsparcie naukowe i życzliwość, co miało kluczowy wpływ na realizację badań. W podziękowaniach autorka cytuje Marię Skłodowską-Curie: „Uczony jest w swojej pracowni nie tylko technikiem, lecz również dzieckiem wpatrzonym w zjawiska przyrody, wzruszające jak czarodziejska baśń”. Ten cytat doskonale oddaje atmosferę dociekania naukowego, w której mgr Miskiewicz mogła rozwijać swoje pasje. Na podstawie moich licznych doświadczeń związanych z recenzjami prac doktorskich zauważyłam, że cytaty Marii Skłodowskiej-Curie są najczęściej wybierane przez młodych naukowców jako inspirujące motto. Co ciekawe, w każdej pracy, którą miałam okazję recenzować, cytaty te różnią się między sobą. W mojej własnej rozprawie doktorskiej również przywołałam słowa Marii Skłodowskiej-Curie, co jeszcze bardziej podkreśla, jak różnorodne i głębokie są jej myśli, które trafiają do kolejnych pokoleń badaczy. Cieszę się, że postać Marii Skłodowskiej-Curie pozostaje niezmiennie żywa w świadomości młodych naukowców. Szczególnie cenne jest to, że Skłodowska-Curie wspierała młodych badaczy, zwłaszcza kobiety, co sprawia, że jej dziedzictwo naukowe i duch wciąż inspirowe współczesny świat nauki.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym „Wstęp” Doktorantka przekonała czytelnika o problemie oporności bakterii na antybiotyki. Autorka podkreśliła, że zjawisko to stanowi poważne

zagrożenie, przyczyniając się do wzrostu śmiertelności na skutek infekcji, które dotychczas były skutecznie leczone. Podała, że według danych z 2019 roku, oporność bakterii odpowiada za ponad 1,3 miliona zgonów rocznie. W związku z tym pojawia się pilna potrzeba opracowania nowych terapii. Ten fragment pracy przeczytała z dużym zainteresowaniem gdyż Doktorantka opisała w ujęciu historycznym sposoby leczenia zakażeń bakteryjnych. Opis jest napisany przystępnie, dzięki czemu czyta się go z lekkością, niemal jak powieść historyczną. Ogólnie, muszę przyznać, że Doktorantka ma łatwość pisania, co sprawia, że cała praca jest bardzo przyjemna w odbiorze i czyta się ją z dużą swobodą.

Ogólnym celem pracy doktorskiej mgr Joanny Miszkiewicz było **opracowanie i zbadanie nowych potencjalnych strategii przeciwbakteryjnych opartych na kwasach nukleinowych oraz peptydomimetykach**. Praca koncentrowała się na trzech podejściach, które mogłyby prowadzić do zahamowania wzrostu bakterii lub umożliwić skuteczny transport cząsteczek do komórek bakteryjnych. Pierwsza strategia zakładała wykorzystanie rybozymów hammerhead do przecięcia mRNA kodującego białko przenoszące grupy acylowe (ACP), które jest niezbędne do wzrostu bakterii. Autorka zaprojektowała różne warianty rybozymów i przeprowadziła ich testy *in vitro* pod kątem stabilności oraz skuteczności w hydrolizie mRNA. Następnie rybozomy zostały umieszczone na plazmidach i badane *in vivo* w komórkach *Escherichia coli*, aby sprawdzić ich działanie katalityczne i zdolność do inhibicji wzrostu bakterii. Druga strategia polegała na opracowaniu peptydów o słabej aktywności przeciwbakteryjnej, takich jak anoplina, które zostały zmodyfikowane za pomocą łańcuchów węglowodorowych, co miało na celu stabilizację ich struktury drugorzędowej. Zmodyfikowane peptydy były testowane na bakteriach Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, aby określić ich zdolność do destabilizacji błon komórkowych i inhibicji wzrostu bakterii. Trzecia strategia dotyczyła zbadania transportu peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) do komórek bakterii z użyciem witaminy B12 jako nośnika. Badania miały na celu określenie, czy PNA może być skutecznie transportowane do komórek *E. coli* poprzez receptory witaminy B12 oraz czy wiązanie PNA z komplementarnym mRNA prowadzi do zahamowania wzrostu bakterii.

W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej, zatytułowany „Metody doświadczalne”, Doktorantka opisała teoretyczne podstawy oraz szczegóły praktyczne technik stosowanych w eksperymentach biofizycznych i biologii molekularnej, i które stosowała w swojej codziennej pracy laboratoryjnej. Omawiane metody obejmują izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC), elektroforezę żelową, spektroskopię UV-VIS, spektroskopię fluorescencyjną, reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), klonowanie molekularne, transformację wektorową metodą szoku cieplnego, a także badania minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii i podstawy analizy statystycznej. Każda z tych technik została opisana pod względem jej zastosowania, sposobu przeprowadzania eksperymentu oraz interpretacji wyników. Na szczególną uwagę zasługuje opis wykorzystania izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego do analizy kinetyki wiązania rybozymu

hammerhead z jego substratem, co pozwoliło jej na precyzyjną ocenę efektywności katalitycznej rybozemu.

Rozdział „Wyniki” w rozprawie doktorskiej mgr Joanny Miszkiewicz jest najważniejszym i największym objętościowo elementem pracy, w którym Doktorantka szczegółowo przedstawiła wyniki uzyskane podczas realizacji trzech głównych strategii badawczych.

Pierwsza część rozdziału poświęcona jest badaniom nad rybozymami hammerhead, które miały na celu hydrolizę mRNA kodującego białko przenoszące grupy acylowe (ACP) lub transferazę enoilopirogronianową (EPT) lub czynnik recyklingu rybosomów (RRF) w komórkach bakterii *Escherichia coli*. Pani Miszkiewicz przeprowadziła szczegółową analizę kinetyczną zaprojektowanych rybozymów, w tym ich stabilność i zdolność do tworzenia kompleksów z docelowym mRNA. W badaniach *in vitro* wykazała, że różne warianty rybozymów o różnej długości ramion wykazywały różną efektywność cięcia mRNA, co pozwoliło jej na wyselekcjonowanie najlepiej działających rybozymów. Te najbardziej skuteczne konstrukty zostały następnie wprowadzone do komórek *E. coli*, gdzie p. Miszkiewicz obserwowała inhibicję wzrostu bakterii. Co więcej, interesującym odkryciem było zjawisko synergii między działaniem rybozemu a antybiotykiem tetracykliną. Taka kombinacja prowadziła do silniejszej inhibicji wzrostu bakterii niż przy zastosowaniu tych związków osobno. Wyniki te sugerują, że rybozemy mogą być obiecującym narzędziem w walce z bakteriami opornymi na antybiotyki, szczególnie w terapii kombinowanej.

Druga część wyników dotyczy badań nad peptydomimetykami. Doktorantka wykazała, że peptydy o naturalnie słabej aktywności przeciwbakteryjnej, takie jak anoplina, mogą być chemicznie modyfikowane w celu zwiększenia ich skuteczności biologicznej. Zastosowanie stabilizujących łańcuchów węglowodorowych pozwoliło na utworzenie stabilnej struktury helikalnej, która lepiej oddziaływała z błonami komórkowymi bakterii. Testy przeprowadzone na szczepach Gram-ujemnych i Gram-dodatnich wykazały, że zmodyfikowane peptydy mają znacznie większy potencjał przeciwbakteryjny niż ich niemodyfikowane odpowiedniki. Ciekawym wnioskiem było to, że skuteczność peptydomimetyków zależała od właściwości szczepów bakterii – szczepy Gram-ujemne były bardziej wrażliwe na peptydy hydrofilowe, podczas gdy Gram-dodatnie wykazywały większą wrażliwość na pochodne bardziej hydrofobowe. Mgr Miszkiewicz udowodniła, że analog [2-6] wykazał najwyższą aktywność przeciwbakteryjną, obniżając wartość MIC nawet 16-krotnie w porównaniu do niemodyfikowanej anopliny, zwłaszcza wobec szczepów Gram-ujemnych *E. coli* ESBL+. Analog ten nie wykazywał cytotoksyczności ani hemolityczności. Wyniki te potwierdzają, że stabilizacja struktury peptydu, może wielokrotnie zwiększyć jego aktywność przeciwbakteryjną, co otwiera nowe możliwości w projektowaniu leków opartych na peptydach.

Trzecia część wyników dotyczyła badań nad transportem peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) do komórek bakterii z wykorzystaniem witaminy B12 jako nośnika. PNA to syntetyczne analogi DNA, które mogą wiązać się z mRNA i blokować jego translację, co skutkuje

inhibicją wzrostu bakterii. Autorka zaprojektowała koniugaty PNA z witaminą B12 i badała ich transport do komórek *Escherichia coli*. Przeprowadzone badania wykazały, że PNA związane z witaminą B12 są transportowane do wnętrza komórek bakteryjnych przez te same receptory, które są odpowiedzialne za transport wolnej witaminy B12. Doktorantka zaobserwowała, że proces ten skutkuje efektywnym dostarczaniem PNA do komórek bakterii, co umożliwia ich dalsze oddziaływanie z docelowym mRNA. Badania te są przełomowe, ponieważ udowodniły, że transportery witaminy B12 mogą być wykorzystywane do dostarczania innych terapeutycznych cząsteczek do bakterii, co może znaleźć zastosowanie w projektowaniu nowych, bardziej celowanych terapii przeciwbakteryjnych. Mgr Miszkiewicz wykazała, że koniugaty PNA z witaminą B12 skutecznie hamują ekspresję mRNA i zmniejszają poziom fluorescencji białka reporterowego w komórkach *E. coli*, co potwierdza efektywność proponowanego mechanizmu dostarczania PNA.

Rozdział „Wyniki” podsumowuje także kluczowe wnioski płynące z każdego z trzech podejść. Autorka szczegółowo omawia wpływ struktury chemicznej rybozymów, peptydów oraz koniugatów PNA na ich efektywność w badaniach biologicznych, co świadczy o głębokim zrozumieniu mechanizmów działania badanych związków. Wszystkie uzyskane wyniki są prezentowane w sposób przejrzysty, z dokładnymi analizami statystycznymi, co pozwala na ich rzetelną ocenę.

Ostatni rozdział pracy doktorskiej, zatytułowany „Podsumowanie pracy” zawiera krótkie zestawienie uzyskanych wyników pracy doktorskiej. Do najważniejszych wyników pracy doktorskiej zaliczyć należy: (i) opracowanie nowych strategii przeciwbakteryjnych opartych na rybozymach, peptydach i peptydomimetykach, które przyczyniły się do zahamowania wzrostu bakterii lub umożliwiły transport cząsteczek do wnętrza komórek bakteryjnych; (ii) w strategii związanej z rybozymem typu hammerhead, Doktorantka wybrała i zaprojektowała rybozimy skierowane przeciwko kluczowym mRNA genów bakterii (*acpP*, *frr*, *murA*). Wykazała ich zdolność do cięcia mRNA, co prowadziło do zahamowania translacji, a w konsekwencji wzrostu bakterii; (iii) w drugiej strategii, obejmującej peptydy i peptydomimetyki, zbadała ich skuteczność w przerwaniu ciągłości błon komórkowych bakterii, co również prowadziło do zahamowania ich wzrostu; (iv) trzecia strategia dotyczyła transportu peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) do wnętrza komórek bakteryjnych za pomocą koniugatów z witaminą B12. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę potwierdziły skuteczność tej metody w dostarczaniu oligonukleotydów do komórek *E. coli*.

Po lekturze pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania:

- (i) Wyniki pracy wskazują, że zaprojektowane rybozimy hammerhead wykazały ograniczoną skuteczność w hamowaniu wzrostu bakterii w pożywkach bogatych, takich jak LB, co zostało szczegółowo omówione w rozdziale wyników. Bogata pożywka mogła zamaskować potencjalną aktywność rybozymu, co prowadziło do trudności w obserwacji jego działania. Aktywność rybozymu była lepiej widoczna w pożywkach minimalnych, takich jak pożywka Davisa. Czy istnieje jakiś sposób, żeby ten problem rozwiązać?

- (ii) Czy istnieją przesłanki, aby uznać, że połączenie rybozymów z innymi antybiotykami mogłoby wzmocnić ich skuteczność?
- (iii) Jak oznaczona została helikalność badanych cząsteczek (Tabela 14., str. 88)
- (iv) W mojej ocenie, w Tabeli 18. niepotrzebne są oznaczenia N_{koniec} i C_{koniec} . Wiadomo że zapisuje się sekwencję peptydów lewej do prawej od N do C końca.
- (v) Czy badane cząsteczki, szczególnie te aktywne objęte zostały zgłoszeniem patentowym? Która ze strategii wg Doktorantki byłaby najlepsza do wdrożenia?
- (vi) Struktura „zszytego” analogu anopliny posiada taką samą strukturę w buforze (środowisko hydrofilowe) i w środowisku błony biologicznej SDS/DPV/POPG/POPC (środowisko hydrofobowe). To może sugerować, że peptydy będące analogami anopliny nie wiążą się z błoną komórkową. Taka zmiana zachodzi w przypadku natywnego peptydu anopliny. W jaki sposób, używając technik biofizycznych, można by potwierdzić ich oddziaływanie z błoną?
- (vii) Która ze strategii przeciwbakteryjnych, nad którymi pracowała Doktorantka w swojej pracy doktorskiej, jest najbardziej obiecująca? Jakie mogą być dalsze kierunki badań wynikające z przedstawionych strategii przeciwbakteryjnych?

Na zakończenie recenzji warto podkreślić, że pani mgr Joanna Miskiewicz, brała udział w sześciu grantach badawczych, z których w dwóch pełniła rolę kierownika projektu. Pierwszym z nich był grant PRELUDIUM finansowany przez Narodowe Centrum Nauki. Drugim projektem, w którym była kierownikiem, był grant obliczeniowy. Oprócz pełnienia funkcji kierownika w powyższych projektach, Doktorantka jest lub była również zaangażowana jako członek zespołu badawczego w czterech innych grantach, w tym OPUS i SONATA, gdzie prowadzi(ła) badania nad systemami transportu peptydowych kwasów nukleinowych oraz koniugatami aminoglikozydów jako potencjalnymi środkami przeciwbakteryjnymi. Moim zdaniem Doktorantka wyróżnia się dużą pracowitością oraz bogatym doświadczeniem zdobytym w różnych projektach.

Dorobek publikacyjny doktorantki obejmuje siedem artykułów naukowych, w tym publikacje w renomowanych czasopismach takich jak *Scientific Reports*, *Frontiers in Microbiology*, *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Molecules*. Artykuły te dotyczą m.in. badań nad rybozymami, peptydami oraz peptydowym kwasem nukleinowym, co stanowi wybitny wkład w rozwój nowych strategii przeciwbakteryjnych. Doktorantka brała również czynny udział w licznych konferencjach naukowych, prezentując wyniki swoich badań zarówno w formie referatów ustnych, jak i plakatów. Łącznie przedstawiła swoje wyniki na 16 konferencjach międzynarodowych i krajowych, w tym na prestiżowych wydarzeniach takich jak EMBO Workshop, Gordon Research Conference, oraz 7th Central European Congress of Life Sciences EuroBiotech. Wyniki jej badań były także prezentowane na sesjach dotyczących zaawansowanych metod komputerowych w biologii molekularnej, co podkreśla interdyscyplinarny charakter jej pracy naukowej. Ten imponujący dorobek naukowy

świadczy o wybitnych osiągnięciach Doktorantki, zarówno w zakresie prowadzenia badań, jak i ich upowszechniania, co czyni ją, w mojej opinii wyróżniającą się młodą badaczką.

Uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej mgr Joanny Miskiewicz jest niezwykle aktualna i istotna w obliczu narastającego problemu oporności bakterii na antybiotyki, co stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. W obliczu rosnącej liczby infekcji wywołanych przez szczepy wielolekooporne, poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, takich jak te zaprezentowane w rozprawie, jest kluczowe. Część doświadczalna pracy została starannie zaplanowana, a wyniki zostały dogłębnie zanalizowane i trafnie zinterpretowane. Doktorantka zaprezentowała solidny, innowacyjny i wartościowy materiał badawczy, który ma potencjalnie szerokie zastosowanie w przyszłych badaniach nad nowymi terapiami przeciwbakteryjnymi. Praca ta przyczynia się do poszerzenia wiedzy na temat alternatywnych metod walki z bakteriami opornymi na tradycyjne antybiotyki. Warto zaznaczyć, że Doktorantka posiada doskonały warsztat badawczy i świetnie posługuje się technikami z zakresu biofizyki, mikrobiologii, biologii molekularnej i inżynierii

Biorąc pod uwagę powyższe fakty, stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia wszystkie ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim, zgodnie z wymaganiami artykułu 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie mgr Joanny Miskiewicz do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki fizyczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w rozwój wiedzy na temat nowoczesnych terapii przeciwbakteryjnych, szczególnie w zakresie wykorzystania rybozemu hammerhead do celowanego cięcia mRNA bakterii, co skutkuje inhibicją wzrostu *Escherichia coli*, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy. Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Joanny Miskiewicz uzasadniam innowacyjnym charakterem jej badań oraz znaczącym wkładem w dziedzinie walki z narastającą opornością bakterii na antybiotyki, co stanowi obecnie jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny.

