

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAB
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
agata.starosta@ibb.waw.pl
tel. 22 592 3341

Warszawa, 14.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Jakuba Skibińskiego

Rozprawa doktorska zatytułowana „Identyfikacja niskocząsteczkowych związków hamujących aktywność wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori*” została przygotowana przez Pana mgra Jakuba Skibińskiego pod opieką promotorską prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmiela. Praca była realizowana w ramach grantu NCN SONATA BIS 9 przyznanej dla prof. UŁ, dr hab. Przemysława Płocińskiego oraz Doktoranckiego Grantu Badawczego IDUB UŁ przyznanego Panu Skibińskiemu. Praca w dyscyplinie nauk biologicznych została przedłożona Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest opisanie funkcji wybranych komponentów degradosomu *Helicobacter pylori*, zwłaszcza fosforylasy polinukleotydowej (PNPazy) i jej znaczenia jako potencjalnego celu terapeutycznego.

Praca doktorska mgr Jakuba Skibińskiego została napisana w języku polskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest właściwy i prawidłowy dla danego formatu. Praca jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Wstęp*, *Cele Pracy*, *Materiały*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusję* i *Wnioski*. *Streszczeni* umieszczone jest na końcu. Autor wykorzystał obszerną bibliografię odwołującą się do 162 artykułów naukowych. Autor stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. W pracy brakuje listy rycin. Praca jest przejrzysta. Tekst opatrzonej jest 39 rycinami i 15 tabelami. Ryciny są często mało czytelne, w niskiej rozdzielczości i słabo opisane. Bibliografia została odpowiednio wykorzystana w tekście i we właściwy sposób w dyskusji wyników.

W pierwszym rozdziale, *Wstęp*, autor rozpoczyna zwięzłym opisem charakterystyki bakterii *Helicobacter pylori*, w tym elementów determinujących wirulencję, diagnostyki zakażeń bakterią i metod leczenia oraz problemu lekooporności. Następnie autor opisuje degradosom *H. pylori*, poszczególne komponenty kompleksu i porównuje je z innymi bakteriami – *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Autor opisuje między innymi fosforylase polinukleotydową (PNPaza), helikazę RhpA czy też RNAzy wchodzące w skład kompleksu. Ryciny przedstawiające wspomniane enzymy nie wnoszą wiele do opisu, są niskiej rozdzielczości, na strukturach autor mógł zaznaczyć wskazane na schemacie domeny. Autor kończy *Wstęp* opisem nukleotransferaz związanych z metabolizmem tRNA oraz ich relacją z degradosomem RNA.

Następnie, autor przedstawia szczegółowy *Cel pracy* oraz wskazuje zadania pośrednie mające na celu realizację głównego zadania oraz zadania, które nie wiążą się bezpośrednio z głównym celem. Wyniki przedstawione w pracy są nowe.

W rozdziale *Materiały* autor podaje listy szczepów bakteryjnych, oligonukleotydów, plazmidów, enzymów, buforów i odczynniki do oczyszczania i analizy białek, listę odczynników, kitów, których używał w pracy eksperymentalnej. W części opisującej *Metody*, autor opisuje protokoły, z których korzystał w celu realizacji zadań badawczych. Opisane są między innymi procedury hodowli bakterii, analizy i manipulacji DNA, przygotowania i analizy RNA, w tym analizy transkryptomów, przygotowania, oczyszczania i analizy białek rekombinowanych do dalszych celów, takich jak mikroskopia krio-elektronowa, oddziaływania białko-białko, aktywności enzymatyczne, testy mikrobiologiczne. Rozdział jest przygotowany ze starannością, uwzględnione są szczegółowe procedury.

Sekcję *Wyniki* autor rozpoczyna opisem przygotowania konstruktów do wyrażania rekombinowanych białek PNP, RhpA i PapS z *H. pylori* oraz opisem ich oczyszczania za pomocą chromatografii powinowactwa, jonowymiennej i żelowej. Autor przedstawia zdjęcia żeli poliakrylamidowych SDS-PAGE pokazujące rozdział elektroforetyczny białek. Wszystkie trzy białka pokazane na zdjęciach udało się oczyścić w wysokim stopniu. Jednak na zdjęciach trudno określić choćby, jakiej masy są przedstawiane białka. Drabinka z markerami masy cząsteczkowej jest niepodpisana i nie koreluje z umieszczonym na rycinie standardem. Na różnych żelach białko migruje na różnych wysokościach. Można domniemywać, że autor nie zawsze prowadził pełny rozdział elektroforetyczny. Na co wskazuje odległość między prążkami markera. Tym bardziej wskazane jest podpisanie prążków.

Następnie, autor opisuje analizę strukturalną białka PNP przy pomocy mikroskopii krio-elektronowej. Akapit jest bardzo krótki, zdawkowy. Trudno określić udział autora w tym procesie. Brakuje danych dotyczących analizy: jak były zamrażane próbki na siateczkach (gridach), ile zostało zebranych danych, jak dane były przetwarzane, statystyk dotyczących zebranych danych. Ten rozdział nie wnosi istotnych informacji do pracy doktorskiej. W kolejnej części sekcji *Wyników*, autor przedstawia wyniki pomiarów aktywności enzymatycznych oczyszczonych białek. W pierwszej kolejności skupia się na aktywności (I) polimeryzacyjnej i (II) degradacji polyA przez białko PNP. Autor wykorzystuje do tego barwnik fluorescencyjny i ssDNA. Nie jest jasne, dlaczego użyto ssDNA zamiast RNA (którego autor używa w czasie analiz dla białka PapS). Mierzono jedynie fluorescencję. Brakuje analizy elektrofotograficznej do monitorowania reakcji. W tym miejscu autor umieszcza krótki rozdział (6.3.4) dotyczący przesiewowych testów potencjalnych inhibitorów aktywności PNPazy. Rozwinięcie tego rozdziału (6.8) pojawia się ponownie w dalszej części *Wyników*. Informacje w obu rozdziałach są powtórzone. Następnie autor opisuje aktywności związane z białkiem PapS, w tym możliwość dodawania nukleotydów CCA do tRNA oraz bada oddziaływanie białka PapS z RhpA. Wyniki badania oddziaływania są niemożliwe do interpretacji ze względu na niewystarczającą liczbę powtórzeń. Pojawia się również pytanie, czy do efektywnego oddziaływania nie jest potrzebna obecność substratu RNA. Autor przeprowadza analizę sekwencji PapS z innymi enzymami dodającymi CCA, ale nie przeprowadził mutagenезy i analiz z mutantami, żeby potwierdzić swoje obserwacje.

W kolejnej części *Wyników* autor opisuje, jak przygotował szczepy delecyjne *H. pylorii* dla białek PNP, RhpA i PapS. Autor przygotowuje również szczep z komplementacją dla genu kodującego białko PNP.

Na Rycinie 24 autor wskazuje, że w szczepie pozbawionym genu *pnp* nie wykrywa białka PNP metodą Western Blot. Ale używa przeciwciał do detekcji metki znakującej białko (Strep-tag II). To nie jest właściwa metoda do detekcji endogennego białka. Natomiast autor potwierdza wyrażanie białka PAN w szczepie z komplementacją genu *pnp*. Następnie autor wykonuje szereg testów fenotypowych szczepów *H. pylori*: szczepu dzikiego, Δpnp i Δpnp + PNP, w tym ruchliwość i tworzenie biofilmu. W pracy doktorskiej brakuje prezentacji tych pomiarów (np. zdjęć płytek czy biofilmu). Przy pomiarach krzywych wzrostu w różnych temperaturach zabrakło obrazu kolonii. Czy szczep dziki i mutanty mają podobną wielkość komórek? Czy pomiar rozpraszania światła przy 600 nm jest porównywalny dla różnych szczepów? Zabrakło przedstawienia jednostki tworzącej kolonie, z angielskiego: 'Colony Forming Units' (CFU) w korelacji z pomiarem OD600 nm. Autor mierzy również aktywność katalazy i ureazy dla szczepu dzikiego, Δpnp i Δpnp + PNP, chociaż nie wyjaśnia, w jakim celu. W kolejnych rozdziałach autor mierzy wrażliwość szczepów na wybrane antybiotyki i czynniki genotoksyczne poprzez dyfuzję substancji z dysku (brakuje zdjęć testów), przeżywalność szczepów po ekspozycji na promieniowanie UV i ponownie wrażliwość na antybiotyki, ale tym razem mierzy ich wzrost w pożywkach płynnych. Rozdział jest chaotyczny, kolejność opisywanych badań jest ułożona mało logicznie i nie jest wskazany cel prowadzonych badań. Jak on koreluje z białkiem PNP?

W kolejnej części autor przedstawia wyniki analiz transkryptomów (RNA-seq). Pojawia się pytanie, dlaczego w sekwencjonowaniu wybrano protokół z krótkimi odczytami 75 nt? W opisie wyników RNA-seq brakuje statystyki sekwencjonowania, liczby odczytów, jakości odczytów, efektywności usunięcia rybosomalnego RNA, dystrybucji GC w próbkach. Autor rozpoczyna analizy od porównania transkryptomu szczepu dzikiego *H. pylori* i Δpnp . Następnie szczepu dzikiego oraz $\Delta rhpA$ i $\Delta papS$. Autor prezentuje jedynie porównania profili transkryptomicznych w formie wykresów wulkanowych. Zabrakło szczegółowej analizy, np. map cieplnych dla genów degradosomu RNA, dystrybucji odczytów na ramkach odczytu (może być zmieniona przy defektach degradosomu), dystrybucji GC w odczytach (zaburzona degradacja może być uwidoczniła w odchyleniach składu GC odczytów). W wynikach zastanawia obecność tRNA. Większość protokołów izolacji RNA usuwa mniejsze frakcje RNA, w tym tRNA. Należy również pamiętać, że tRNA są silnie modyfikowane i przy klasycznym RNA-seq zliczanie tRNA jest niewiarygodne ze względu na trudności w przepisywaniu modyfikowanych RNA na cDNA. Natomiast wzbogacenie może sugerować nie tyle większą liczbę tRNA, a utratę ich modyfikacji. Z danych RNA-seq nie da się bez dodatkowych modyfikacji określić, czy w komórce było więcej RNA.

W kolejnej części *Wyników* autor wraca do poszukiwania potencjalnych inhibitorów PNPazy. Testuje bibliotekę cząsteczek, prowadzi wstępną selekcję i wybiera 23 związki chemiczne do dalszych testów inhibicji aktywności polimeryzacyjnej i degradacyjnej białka PNP. Cząsteczki testuje *in vivo* i *in vitro*. Brakuje przykładowych krzywych inhibicji, wzrostu bakterii. Żele przedstawiające aktywność PNP *in vitro* są słabo opisane. Autor mógł się pokusić o przedstawienie struktur chemicznych najefektywniejszych związków chemicznych. Tym bardziej, że w pracy są akapity dotyczące struktury białka PNP. Czy można podejrzewać mechanizm działania wybranych związków?

W *Dyskusji* autor podsumowuje przedstawione wyniki w kontekście znanej literatury. Robi to w sposób prawidłowy.

Praca doktorska przedstawiona przez Pana mgra Jakuba Skibińskiego opisuje ciekawe zagadnienie, ale brakuje w pracy opowieści. Autor przedstawił w sposób dość chaotyczny zbiór danych, które mogły być lepiej opracowane i połączone tak, by zbudować historię o PNPasie. Tego zabrakło. Natomiast sama wartość wyników jest znacząca i po odpowiednim opracowaniu oraz dokończeniu prac eksperymentalnych będzie wartością dla dyscypliny. Pozostaje duży niedosyt odnośnie do skąpych analiz danych oraz sekwencji przedstawiania wyników oraz danych przedstawionych z małą starannością (opisy żeli na rycinach). Brakuje kompleksowych analiz, zdjęć źródłowych, których w manuskrypcie nie trzeba załączać, ale w doktoracie powinny się znaleźć. Praca jest mało dojrzała, ale trudno nie dostrzec, że autor włożył dużo pracy w realizację zadań badawczych.

Mimo uwag, przedłożoną mi do oceny pracę oceniam **pozytywnie**.

Stwierdzam, że praca doktorska Pana mgra Jakuba Skibińskiego spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.).

Zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgra Jakuba Skibińskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAN