

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Jakuba Mikołaja Skibińskiego
pod tytułem**

***„Identyfikacja niskocząsteczkowych związków hamujących aktywność wybranych enzymów
zaangażowanych w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori*”***

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **mgr Jakuba Mikołaja Skibińskiego** została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmiela w Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.

Badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały zrealizowane dzięki finansowaniu Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu „SONATA BIS 9” (nr 2019/34/E/NZ1/00338) pt. *„Badania strukturalne udziału degradosomu RNA w trans- translacji w świetle przeciwbakteryjnej aktywności pirazynamidu – perspektywy wynalezienia leków przeciw(myko)bakteryjnych”*, kierowanego przez dr hab. Przemysława Płocińskiego, prof. UŁ, w którym Doktorant pełnił rolę wykonawcy. Praca powstała również w ramach Konkursu Grantowego Uniwersytetu Łódzkiego „Doktoranckie Granty Badawcze IDUB – edycja 2023” (program „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”), w ramach projektu pt. *„Identyfikacja funkcji białka PapS u *Helicobacter pylori* w metabolizmie tRNA”*, którego kierownikiem był mgr Jakub Skibiński.

Uzasadnienie podjętego przez doktoranta tematu badawczego, zatytułowanego *„Identyfikacja niskocząsteczkowych związków hamujących aktywność wybranych enzymów zaangażowanych w metabolizm RNA u *Helicobacter pylori*”*, jest w świetle obecnego stanu wiedzy w pełni zasadne i celowe. Zakażenia bakterią *H. pylori* stanowią poważny problem kliniczny na skalę światową, będąc główną przyczyną chorób wrzodowych żołądka oraz istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka żołądka. Narastająca oporność tego patogenu na powszechnie stosowane antybiotyki, wynikająca z jego wysokiej zmienności genetycznej oraz zdolności do tworzenia biofilmu, drastycznie ogranicza skuteczność dotychczasowych schematów eradykacji. W tym kontekście poszukiwanie nowych celów terapeutycznych jest pilną potrzebą medyczną. Enzymy zaangażowane w metabolizm RNA, ze względu na ich kluczową rolę w procesach replikacji, transkrypcji oraz regulacji ekspresji genów bakteryjnych, stanowią niezwykle atrakcyjne, a zarazem słabo jeszcze rozpoznane cele dla nowych leków. W szczególności skoncentrowanie się Doktoranta na badaniu roli polinukleotydofosforylasy

(PNPaza, białko PNP) jest trafnym posunięciem, gdyż enzym ten, posiadający właściwości egzonukleolityczne oraz zdolność do polimeryzacji rybonukleotydów, odgrywa fundamentalną rolę w kontroli jakości RNA i modulowaniu ekspresji genów wirulencji. Ze względu na fakt, że PNPaza jest enzymem niezbędnym dla przetrwania wielu patogennych bakterii, a jej struktura wykazuje istotne różnice funkcjonalne w porównaniu do odpowiedników eukariotycznych, stanowi ona niezwykle atrakcyjny, a zarazem unikalny cel dla terapii celowanej. Dlatego identyfikacja małocząsteczkowych inhibitorów PNPaży oraz innych komponentów degradosomu otwiera drogę do zaprojektowania nowoczesnych strategii terapeutycznych, które mogłyby skutecznie blokować kluczowe procesy metaboliczne *H. pylori*, przy jednoczesnym ograniczeniu negatywnego wpływu na mikrobiotę pacjenta. Podjęcie badań nad tym zagadnieniem wypełnia istotną lukę w literaturze przedmiotu, łącząc zaawansowaną biochemię strukturalną z praktycznym wymiarem projektowania leków. Praca ta jest zatem nie tylko naukowo uzasadniona, ale również wysoce innowacyjna w obliczu globalnego kryzysu antybiotykowego, oferując nowatorskie podejście do zwalczania zakażeń opornymi szczepami *H. pylori*.

Ocena formalna

Struktura rozprawy doktorskiej Pana mgr. Jakuba Skibińskiego jest w pełni poprawna, logiczna i wykazuje wysoką dbałość o warsztat naukowy. Podział treści odzwierciedla klasyczny model wywodu naukowego, co pozwala na przejrzyste śledzenie procesu badawczego – od podstaw teoretycznych, przez rygorystyczny opis metodyki, aż po szczegółową prezentację wyników i ich krytyczną interpretację. Praca, zrealizowana w ramach współpracy z takimi jednostkami jak Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Uniwersytet Gdański oraz Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, dokumentuje badania nad kluczowymi komponentami degradosomu RNA *H. pylori* (PNP, RhpA, PapS). Układ treści potwierdza, że formalnie praca jest typową monografią naukową, przygotowaną zgodnie z tradycyjnymi wymogami stawianymi dysertacjom doktorskim. Dodatkowo dysertacja zawiera niezbędne elementy formalne, takie jak wykaz skrótów, podziękowania oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca stanowi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów metabolizmu RNA u tego patogenu, co zostało poparte m.in. analizami transkryptomycznymi oraz testami fenotypowymi szczepów delecyjnych.

Ocena merytoryczna

Wstęp teoretyczny dysertacji stanowi dojrzałe i wyczerpujące wprowadzenie w problematykę badawczą, wykazując pełną spójność z tytułem oraz zakresem merytorycznym pracy. Struktura tekstu jest przejrzysta, logiczna i w pełni odpowiada standardom obowiązującym w monografiach naukowych. Doktorant w sposób usystematyzowany wprowadza czytelnika w problematykę metabolizmu RNA, przechodząc od ogólnych mechanizmów funkcjonowania komórek prokariotycznych, aż do specyfiki patogenu *H. pylori*. Na szczególną uwagę zasługuje rzetelne scharakteryzowanie tzw. degradosomu minimalnego, w skład którego wchodzi rybonukleaza J (RNaza J) oraz helikaza RNA (RhpA). Doktorant trafnie identyfikuje kluczową rolę tych enzymów w procesach degradacji i dojrzewania cząsteczek RNA, podkreślając jednocześnie znaczenie synergistycznej interakcji między nimi dla adaptacji patogenu do warunków środowiskowych żołądka. Z merytorycznego punktu widzenia tekst jest poprawny i oparty na aktualnym piśmiennictwie. Bardzo dobrze wyeksponowano różnice strukturalne i funkcjonalne pomiędzy organizmami modelowymi (jak *E. coli* czy *B. subtilis*) a *H. pylori*, co stanowi solidny fundament dla dalszej części pracy eksperymentalnej. Poprawnie sformułowano definicje i wyjaśniono różnice między prokariotycznymi degradosomami a eukariotycznymi egzosomami, co eliminuje ryzyko nieścisłości terminologicznych. We wstępie nie stwierdziłem błędów merytorycznych.

Mam jednak drobne sugestie, które mogą przydać się podczas przygotowywania w przyszłości publikacji naukowych.

Doktorant wymienia przeciwciała klasy IgM/IgG w diagnostyce serologicznej *H. pylori*. Należy zaznaczyć, że w praktyce klinicznej złota zasada serologii dotyczy niemal wyłącznie przeciwciał klasy IgG (i ewentualnie IgA). Przeciwciała klasy IgM nie są użyteczne w diagnostyce zakażeń *H. pylori*, gdyż zakażenie to ma charakter przewlekły, a odpowiedź IgM jest krótkotrwała. Zaleca się usunięcie lub ograniczenie zapisu do IgG.

Doktorant słusznie przywołuje rolę PNPazy w degradacji oksydacyjnie uszkodzonego RNA. Warto jednak dodać jedno zdanie wyjaśniające, czy sugerowana rola „usuwania uszkodzonych łańcuchów” jest procesem wysoce specyficznym (tzn. czy PNPaza rozpoznaje 8-oxoG bezpośrednio?), czy też jest to wynik jej ogólnej aktywności na niestabilnych, uszkodzonych strukturach RNA?

W tabeli 1, w wierszu dotyczącym „katalazy, peroksydazy nadadtlenkowej”, w kolumnie „Właściwości biologiczne” wymieniono: „Hamowanie reaktywnych form tlenu

oraz NO₂”. Należy poprawić zapis chemiczny: powinno być NO (tlenek azotu), a nie NO₂ (dwutlenek azotu).

Doktorant napisał: „*LPS zaburza również inne kluczowe ogniwo odporności wrodzonej jakim jest aktywność cytotoksyczna naturalnych komórek zabijających - NK*”. Jest to poprawne, ale w literaturze częściej podkreśla się, że to toksyna VacA bezpośrednio hamuje odpowiedź komórek T i NK. Warto sprawdzić, czy w cytowanym źródle [52] głównym czynnikiem jest LPS, czy VacA, aby zachować precyzję.

Dodatkowo w wierszu „RNaza E” dla *H. pylori* i *C. jejuni* wpisano „Brak”. Jest to poprawne, ale w kolumnie „Funkcja i uwagi” warto dodać, że chociaż homologa RNazy E nie ma, to funkcje endorybonukleolityczne są przejęte przez inne enzymy (co jest zresztą wskazane w tabeli, ale warto zachować pełną spójność wizualną).

Sformułowany cel pracy doktorskiej mgr. Jakuba Skibińskiego jest precyzyjny, logicznie ustrukturyzowany i w pełni adekwatny do tematyki rozprawy, wskazując na wysoki poziom dojrzałości naukowej Doktoranta. Projekt badawczy łączy w sobie ambitne cele poznawcze, obejmujące molekularną charakterystykę kluczowych enzymów metabolizmu RNA, z istotnym wymiarem aplikacyjnym, jakim jest poszukiwanie nowych celów terapeutycznych w zwalczaniu zakażeń *H. pylori*.

Cele szczegółowe stanowią spójną i kompletną ścieżkę realizacji postawionego celu, obejmując pełne spektrum metodologii: od inżynierii białek i analizy biochemicznej *in vitro*, poprzez mapowanie interakcji białko-białko, aż po zaawansowane badania funkcjonalne na szczepach delecyjnych. Na szczególną uwagę zasługuje nowatorskie podejście do weryfikacji roli białka PapS oraz próba zintegrowania danych strukturalnych z wynikami testów przesiewowych inhibitorów, co znacznie podnosi wartość naukową dysertacji.

Podsumowując, sformułowany cel naukowy spełnia wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozdział „Materiały i Metody” w przedłożonej pracy doktorskiej jest napisany w sposób rzeczowy, metodyczny i niezwykle szczegółowy, co stanowi jego główną zaletę. Doktorant w sposób uporządkowany przedstawił pełen wachlarz zastosowanych narzędzi badawczych, obejmujący szeroki zakres procedur: od hodowli bakteryjnych (*E. coli* oraz *H. pylori*), przez kompleksowe techniki molekularne (praca z DNA i RNA), aż po zaawansowane metody

biochemiczne i biofizyczne (oczyszczanie białek, Cryo-EM, termoforeza, western blotting). Bardzo korzystne jest wydzielenie osobnych podpunktów dla technik pracy z poszczególnymi kwasami nukleinowymi oraz białkami (podrozdziały 5.2–5.5), co znacząco ułatwia nawigację tekstu i pozwala czytelnikowi precyzyjnie śledzić tok rozumowania badawczego. Wykaz zastosowanych oligonukleotydów, wektorów oraz odczynników chemicznych jest wzorcowy, co zapewnia pełną powtarzalność badań. W nawiązaniu do bogatego zestawu metod, chciałbym prosić Doktoranta o doprecyzowanie kilku kwestii merytorycznych:

Czy przeprowadzono kontrolę, w której badano wpływ obecności tioflawiny T na samą aktywność enzymatyczną PNPazy, aby upewnić się, że barwnik nie działa jako inhibitor w układzie eksperymentalnym?

W testach przesiewowych dopuszczono obecność do 4% DMSO. Czy sprawdzono, czy tak wysokie stężenie rozpuszczalnika w reakcjach z udziałem białka *H. pylori* nie wpływa na stabilność strukturalną PNPazy lub jej powinowactwo do substratu, szczególnie po dłuższym czasie inkubacji?

Czy przy obliczaniu % redukcji resazuryny dla szczepów o różnych fenotypach (np. *Δpnp* wykazujący potencjalnie inny metabolizm) sprawdzano, czy bazowa redukcja w kontroli ujemnej nie różni się istotnie między szczepami? Czy brano pod uwagę, że różnice w tempie wzrostu szczepów mogą wpływać na kinetykę redukcji barwnika w czasie 4-godzinnej inkubacji?

Wspomniano, że związki hamujące >50% aktywności przy 100 μ M testowano ponownie przy 1 μ M, natomiast do dalszych etapów (1 μ M) kwalifikowano te hamujące >90% przy 100 μ M. Czy to oznacza, że związki wykazujące inhibicję pomiędzy 50% a 90% zostały ostatecznie odrzucone jako nieperspektywiczne, czy są one traktowane jako inhibitory o słabszym potencjale?

W metodzie użyto 96% etanolu do utrwalenia biofilmu, a następnie wysuszone płytki w 60°C. Czy tak wysoka temperatura nie wpływa na strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu (ang. *extracellular polymeric substances* – EPS), co mogłoby zafałszować wiązanie fioletu krystalicznego? Czy rozważano niższą temperaturę suszenia?

W metodzie wykorzystano bufor lizujący do *H. pylori*. Czy wykluczono możliwość, że składniki tego buforu (np. detergenty lub związki chelatujące) mogą hamować aktywność enzymatyczną katalazy w trakcie pomiaru spektrofotometrycznego? Czy przed pomiarem usuwano składniki buforu lizującego (np. przez dializę lub wytrącanie)?

W ocenie dynamiki wzrostu w 37°C i 39°C zastosowano ciągle wytrząsanie (140 obr./min.). *H. pylori* jest bakterią mikroaerofilną o specyficznych wymaganiach gazowych. Czy ciągle wytrząsanie w płynnym podłożu nie prowadziło do nadmiernego napowietrzenia hodowli, co mogło wpływać na stres oksydacyjny i tempo wzrostu bardziej niż sama temperatura?

Wybrano dawki 5, 10 i 20 J/m². Na jakiej podstawie wybrano ten zakres i czy w badaniach wstępnych sprawdzono, czy dawka 20 J/m² nie prowadzi do całkowitej śmierci komórek (tzw. *kill curve*), co mogłoby uniemożliwić zaobserwowanie różnic w naprawie DNA między szczepem WT a mutantem?

Rozdział „Wyniki” stanowi niezwykle imponującą i kompleksową część pracy, dowodzącą wysokiego stopnia zaawansowania warsztatu badawczego Doktoranta. Doktorant w sposób logiczny i konsekwentny przeprowadza czytelnika przez cały proces badawczy: od etapu czysto biotechnologicznego (produkcja i oczyszczanie białek), poprzez szczegółowe analizy biochemiczne i strukturalne (aktywność enzymatyczna, oddziaływania międzybiałkowe), aż po rozbudowane badania fenotypowe i omiczne na poziomie komórkowym. Na szczególną uwagę zasługuje interdyscyplinarny charakter prezentowanych danych. Połączenie badań *in vitro* (aktywność PNP, PapS, testy przesiewowe inhibitorów) z eksperymentami *in vivo* na szczepach delecyjnych pozwala na pełne zrozumienie biologicznej roli badanych białek w fizjologii *H. pylori*. Bardzo cenne jest włączenie analiz transkryptomicznych (RNA-seq) dla poszczególnych mutantów, co stanowi istotny fundament dla interpretacji zmian fenotypowych, takich jak różnice w ruchliwości, tworzeniu biofilmu czy wrażliwości na czynniki genotoksyczne. Prezentacja wyników jest bardzo przejrzysta. Wydzielenie sekcji poświęconej poszukiwaniu i walidacji inhibitorów białka PNP świadczy o wysokim potencjale aplikacyjnym pracy. Należy podkreślić dużą dbałość o szczegóły w analizach kinetycznych oraz wysoką jakość dokumentacji badawczej, co czyni ten rozdział niezwykle wartościowym wkładem w badania nad patogenem *H. pylori*.

Za szczególnie wartościowe uważam badania dotyczące konstrukcji szczepów delecyjnych dla białek PNP, RhpA i PapS oraz przywracania genu *pnp*, a także ich szczegółowej charakterystyki fenotypowej i transkryptomicznej. Stworzenie i rzetelna walidacja tych szczepów stanowi solidną bazę dla interpretacji biologicznej roli badanych białek w fizjologii *H. pylori*. Podejście to jest systemowe i łączy analizę fenotypową, obejmującą m.in. ruchliwość, tworzenie biofilmu, aktywność katalazy i ureazy oraz wrażliwość

na stres genotoksyczny i antybiotyki, z pogłębioną analizą transkryptomyczną. Włączenie danych z sekwencjonowania RNA dla każdego z mutantów pozwala na wiarygodne opisanie roli genów *pnp*, *rhpA* oraz *papS* w regulacji genów *H. pylori*. Tak szeroki zakres badań, łączący poziom biochemiczny z poziomem całego organizmu oraz jego profilu transkrypcyjnego, jest niezwykle wymagający i rzadko spotykany, co znacząco podnosi rangę rozprawy. Doktorant w sposób przekonujący wykazuje korelacje między zmianami genetycznymi a fizjologiczną odpowiedzią bakterii, czyniąc ten fragment pracy fundamentem dla zrozumienia funkcjonowania patogenu w warunkach stresu. Po przeczytaniu tego rozdziału nasunęły się mi następujące pytania:

- 1) Doktorant wskazuje, że mimo błędnej klasyfikacji w bazie UniProt jako polimeraza(A) RNA, białko PapS nie wykazuje aktywności poliadenylacyjnej w testach fluorymetrycznych (Ryc. 14), natomiast w żelu UREA-PAGE (Ryc. 15) potwierdzono jego funkcję w dobudowywaniu końca CCA do tRNA. Czy można jednoznacznie stwierdzić, że PapS *H. pylori* jest wyłącznie nukleotydylotransferazą CCA, czy istnieją przesłanki sugerujące, że posiada ona inne, dotychczas nieopisane funkcje w metabolizmie RNA, które nie zostały uchwycone w zastosowanych testach?
- 2) W procesie selekcji inhibitorów PNPazy Doktorant zastosował kryterium wykluczenia związków wykazujących właściwości interkalujące z DNA lub RNA. Jakim konkretnym testem lub procedurą techniczną posłużono się, aby zidentyfikować te nieswoiste interakcje przed etapem badań na całych komórkach?
- 3) W wynikach mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) Doktorant zauważa, że „*ruchliwość domen peryferyjnych może skutkować ich słabszym odwzorowaniem w mapie gęstości*”. Biorąc pod uwagę, że chromatografia SEC wykazała obecność białka PNP w formie trimerycznej (sekcja 6.1.5, Ryc. 12a), w jaki sposób zaobserwowana w cryo-EM „*ruchliwość*” domen peryferyjnych wpływa na wiarygodność projektowania inhibitorów ukierunkowanych na rdzeń katalityczny, jeśli dynamiczne domeny mogą być istotne dla dostępu substratu do tego rdzenia?
- 4) Doktorant wskazuje, że plazmid *SLIC_PNP_HP_CtermStrepTag* nie posiada funkcjonalnego miejsca inicjacji replikacji w *H. pylori*, co wymusza integrację z chromosomem w tzw. strefie plastyczności. Czy w toku badań zweryfikowano, czy integracja ta zachodzi w sposób celowany (poprzez rekombinację homologiczną w obrębie sekwencji flankujących strefę plastyczności), czy też zachodzi ryzyko

przypadkowej insercji w innych regionach genomu, co mogłoby wpłynąć na obserwowany fenotyp szczepu komplementacyjnego?

- 5) Doktorant opisuje wyznaczanie czasu generacji (T_d) na podstawie fazy logarytmicznej wzrostu. W świetle zaobserwowanych znaczących różnic w aktywności katalazy (sekcja 6.6.3) oraz ureazy (sekcja 6.6.4) między szczepem dzikim (WT) a mutantem *Δpnp*, czy wyniki analizy fazy logarytmicznej wykazały również istotne statystycznie różnice w szybkości wzrostu (T_d) między tymi szczepami, czy może *H. pylori* wykazuje mechanizmy kompensacyjne pozwalające zachować tempo podziałów pomimo obniżonej aktywności kluczowych enzymów metabolicznych?

Podobnie jak wcześniej omówione przeze mnie rozdziały dysertacji także rozdział zatytułowany „Dyskusja” stanowi rzetelne i wartościowe opracowanie naukowe, charakteryzujące się wysokim poziomem merytorycznym oraz logiczną strukturą argumentacji. Doktorant bardzo skutecznie osadza własne wyniki badań nad metabolizmem RNA u *H. pylori* w szerszym kontekście literatury przedmiotu, dokonując trafnych porównań do dobrze poznanych modeli bakteryjnych (*E. coli*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis*). Takie podejście pozwala czytelnikowi na pełne zrozumienie specyfiki minimalnego degradosomu *H. pylori* oraz ewolucyjnych uwarunkowań prowadzących do redukcji jego genomu przy zachowaniu krytycznych funkcji regulacyjnych. Do największych zalet dyskusji należy ostrożność interpretacyjna oraz wysoka jakość analizy krytycznej. Doktorant nie nadinterpretowuje uzyskanych danych, co szczególnie wyraźnie widać w przypadku weryfikacji funkcji białka PapS. Zamiast bezkrytycznie przyjmować błędną adnotację z bazy danych, Doktorant na podstawie analizy bioinformatycznej i badań biochemicznych proponuje przeklasyfikowanie tego enzymu na CCA-tRNA nukleotydylotransferazę, co stanowi istotny wkład pracy w korektę wiedzy metabolizmie RNA tego patogenu. Ponadto, warto docenić wielowymiarowość przedstawionych analiz – łączenie wyników biochemicznych (aktywność *in vitro*) z danymi fenotypowymi (ruchliwość, biofilm, przeżywalność w stresie) oraz transkryptomicznymi (RNA-seq) daje spójny i kompletny obraz biologicznego znaczenia badanych białek (PNP, RhpA, PapS).

Dyskusja dotycząca potencjału aplikacyjnego badanych enzymów jest niezwykle aktualna, zwłaszcza w obliczu narastającej antybiotykooporności *H. pylori*. Doktorant słusznie podkreśla, że celowanie w komponenty degradosomu RNA stanowi obiecującą strategię terapeutyczną, a zastosowanie rygorystycznego modelu porównawczego (szczepy WT, *Δpnp*,

pnp⁺⁺) znacząco podnosi wiarygodność tezy, iż PNPaza jest faktycznym celem molekularnym wytypowanych inhibitorów. Tekst jest napisany językiem naukowym o wysokiej precyzji, a cytowana literatura jest trafnie dobrana i adekwatnie skomentowana. Jako kierunek dalszych badań warto rozważyć głębszą analizę przejściowych interakcji białkowych w warunkach fizjologicznego stresu, co mogłoby rzucić nowe światło na funkcjonalną niezależność PNPazy, o której Doktorant słusznie wspomina.

Do tego rozdziału mam jedno pytanie w nawiązaniu do tekstu dotyczącego inhibitorów. Doktorant zauważa, że efektywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych związków (np. niklozamid) jest zależna od obecności funkcjonalnego genu *pnp*. W związku z tym czy przeprowadzone analizy pozwoliły ustalić, czy inhibitory te działają poprzez blokowanie aktywności katalitycznej centrum aktywnego PNPazy (konkurencja z substratem), czy też wywołują efekt hamujący poprzez destabilizację trimerycznej struktury białka, co mogłoby uniemożliwić jego prawidłowe funkcjonowanie w cytoplazmie *H. pylori*?

Wnioski końcowe zawarte w dysertacji zostały w mojej ocenie sformułowane poprawnie oraz adekwatnie do wyników.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Jakuba Skibińskiego w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742, z późn. zm.). Stwierdzam, iż:

1. Sposób ujęcia tematu, rzetelny przegląd literatury oraz precyzyjne osadzenie wyników w kontekście współczesnej nauki dowodzą, że Doktorant posiada pogłębioną i ugruntowaną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne. Doktorant wykazał się biegłością w posługiwaniu się językiem naukowym oraz doskonałym zrozumieniem złożonych procesów biologicznych stanowiących przedmiot badań.
2. Mgr Jakub Skibiński dowiódł, że potrafi samodzielnie planować i realizować zaawansowane prace badawcze. Świadczą o tym poprawnie sformułowane hipotezy, dobór adekwatnych, nowoczesnych metod eksperymentalnych, a także umiejętność krytycznej interpretacji uzyskanych danych oraz wyciągania wyważonych wniosków.
3. Oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego, wnosząc istotny wkład w rozwój dyscypliny. Wysoki potencjał aplikacyjny

i komercyjny przedstawionych rezultatów świadczy o unikatowości rozprawy na tle dotychczasowego stanu wiedzy.

Mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że praca doktorska istotnie poszerza stan wiedzy w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z tym wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr. Jakuba Skibińskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, ze względu na wyjątkową wartość naukową oraz nowatorski charakter wyników o wysokim potencjale wdrożeniowym, z pełnym przekonaniem wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Szczegółowe uzasadnienie wyróżnienia:

Praca doktorska podejmuje niezwykle istotny i aktualny problem medyczny – narastającą antybiotykooporność *H. pylori*, patogenu będącego główną przyczyną chorób wrzodowych i raka żołądka. Poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, zwłaszcza w obszarze metabolizmu RNA, odpowiada na pilną potrzebę opracowania innowacyjnych strategii leczenia. Rozprawa wnosi istotny wkład w zrozumienie mechanizmów metabolizmu RNA u *H. pylori*. Za szczególnie wartościowe należy uznać badania nad rolą białek degradosomu (PNP, RhpA) oraz rozwój i aktualizację wiedzy na temat funkcji białka PapS, które dzięki badaniom Doktoranta zostało poprawnie sklasyfikowane jako nukleotydylotransferaza CCA. Praca wykazuje wysoki potencjał komercyjny i wdrożeniowy. Identyfikacja małocząsteczkowych inhibitorów PNPaży otwiera realną drogę do projektowania nowoczesnych terapii celowanych, które mogłyby skutecznie zwalczać zakażenia opornymi szczepami *H. pylori* przy jednoczesnym ograniczeniu wpływu na mikrobiotę pacjenta. Doktorant zastosował imponujący, interdyscyplinarny zestaw nowoczesnych technik badawczych, obejmujący inżynierię białek, zaawansowane metody biochemiczne i biofizyczne (m.in. Cryo-EM) oraz analizy omiczne (RNA-seq). W szczególności na podkreślenie zasługuje systemowe podejście, integrujące dane strukturalne z wynikami testów przesiewowych inhibitorów oraz weryfikacją fenotypową na skonstruowanych szczepach delecyjnych. Taka kombinacja metod, łącząca poziom molekularny z fizjologią całego organizmu, jest niezwykle wymagająca i rzadko spotykana, co znacząco podnosi rangę rozprawy.