



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2026-09-08

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirsztfeld.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Lewandowskiej pt. „ Rola małych, niekodujących cząsteczek RNA w regulacji rozwoju bakteriofaga Φ 24B oraz jego gospodarza, bakterii *Escherichia coli* produkującej toksynę Shiga”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska autorstwa mgr Natalii Lewandowskiej została przygotowana na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem rozprawy była dr hab. Bożena Nejman-Faleńczuk, a promotorem pomocniczym dr Sylwia Boch. Rozprawę przedłożono Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego. Zarówno promotor, jak i promotor pomocnicza mają bogate doświadczenie badawcze oraz znaczący dorobek naukowy w obszarze tematycznym, którego dotyczy rozprawa.

Rozprawa została przygotowana w formie spójnego cyklu czterech publikacji naukowych, w skład którego weszły trzy oryginalne prace eksperymentalne oraz praca o charakterze przeglądowym. Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch pracach cyklu, w pozostałych dwóch współdzieli pierwszoautorską





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

pozycję z promotor pomocniczą dr Sylwią Bloch. Do publikacji wchodzących w skład ocenianego cyklu dołączono szczegółowe oświadczenia dotyczące indywidualnego wkładu poszczególnych autorów. W mojej opinii oświadczenia te w sposób wystarczający i właściwy dokumentują udział Doktorantki w powstaniu każdej z prac. Chociaż jej rola w publikacjach, gdzie dzieli pozycję pierwszoautorską, nie miała ściśle wiodącego charakteru, wniesiony przez Doktorantkę wkład był bardzo istotny i wystarczający do włączenia ich do rozprawy doktorskiej. Rozprawa nie zawiera zdefiniowanego celu pracy, który mógłby pomóc w zrozumieniu celu i hipotezy badawczej całego projektu doktorskiego. Zawiera bardzo dobrze napisany rozdział stanowiący podsumowanie (w tym wersję anglojęzyczną), informację naukową o autorce, oraz materiały uzupełniające.

Rozprawa dotyczy małych regulatorowych RNA (sRNA) kodowanych przez bakteriofagi Stx, które uczestniczą w kontroli cyklu życiowego faga oraz wpływają na fizjologię bakteryjnego gospodarza. Badania prowadzono głównie na modelowym bakteriofagu $\Phi 24B$, przenoszącym geny toksyny Shiga. Szczególną uwagę poświęcono bardzo krótkim fagowym sRNA, których rozmiar i sposób działania przypominają mikroRNA wirusów eukariotycznych.

Praca nr 1 cyklu została opublikowana w roku 2015 w czasopiśmie *Viruses* i stanowi ona przegląd fagowych sRNA. W pracy tej uporządkowano aktualną wiedzę o regulatorowych RNA pochodzenia fagowego. Opisane cząsteczki sklasyfikowano według kontrolowanych przez nie procesów, obejmujących replikację DNA faga, lizogenizację, podziały komórkowe, metabolizm gospodarza, odpowiedź na stres oraz patogenność bakterii. Przegląd wykazuje, że fagowe sRNA są słabiej poznane niż ich bakteryjne odpowiedniki, mimo że mogą odgrywać istotną rolę w regulacji interakcji fag–gospodarz.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Praca nr 2 została opublikowana w roku 2023 w piśmie PLOS ONE i zawiera charakterystykę molekuly sRNA 24B_1. Częsteczka 24B_1 jest 20-nukleotydowym sRNA powstającym z dłuższego prekursora kodowanego przez faga Φ 24B. Jest to pierwsze funkcjonalne fagowe sRNA o rozmiarze odpowiadającym eukariotycznym mikroRNA. Wykazano, że nadekspresja 24B_1 sprzyja lizogenii. Prowadziła ona do zmniejszenia produkcji potomnych cząstek fagowych i ograniczenia lizy bakterii, zwiększając jednocześnie udział lizogenów wśród komórek, które przetrwały infekcję. Towarzyszył temu wzrost ekspresji fagowych genów związanych z lizogenią, w tym *clI* i *clIII*.

24B_1 wpływała również na metabolizm gospodarza. Jej nadekspresja powodowała obniżenie poziomu ATP i fumaranu oraz akumulację NAD^+ . Zidentyfikowano potencjalne miejsce wiązania 24B_1 w mRNA genu *sdhB*, kodującego podjednostkę dehydrogenazy bursztynianowej, a bezpośrednie oddziaływanie obu RNA potwierdzono *in vitro*. Wyniki wskazują, że 24B_1 może wspierać lizogenię poprzez skoordynowaną regulację genów fagowych i metabolizmu energetycznego bakterii. Stwierdzono także, że białko Hfq wiąże prekursor 24B_1, co sugeruje jego udział w stabilizacji lub dojrzewaniu tej cząsteczki.

Praca nr 3 cyklu została opublikowana w roku 2026 w piśmie *Biochimica et Biophysica Acta* i obejmuje charakterystykę sRNA UpRoi1 jako cząstki fagowego pochodzenia. UpRoi1 jest 30-nukleotydowym sRNA kodowanym w regionie regulatorowym genomu Φ 24B. W przeciwieństwie do 24B_1 wspiera ono rozwój lityczny faga. Ekspresja UpRoi1 wzrastała po indukcji profaga, natomiast jego nadekspresja nasilała lizę bakterii, zmniejszała przeżywalność komórek i powodowała około dziesięciokrotny wzrost liczby cząstek fagowych.

Wykazano, że UpRoi1 wiąże się z regionem 5'UTR transkryptu genu *roi*, kodującego fagowy antyrepresor. Oddziaływanie to jest stabilizowane przez białko ProQ. Zaproponowany mechanizm zakłada, że aktywacja odpowiedzi SOS i degradacja LexA



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

umożliwiają transkrypcję UpRoi1. Częsteczka ta zwiększa następnie ekspresję antyrepresora Roi, co osłabia działanie represora Ci i sprzyja przejściu faga z lizogenii do cyklu litycznego.

UpRoi1 reguluje także geny gospodarza. Jego nadekspresja zmieniała ekspresję ponad 200 genów bakteryjnych, szczególnie związanych z chemotaksją i budową wici. Jako bezpośredni cel zidentyfikowano mRNA genu flgL. Wiązanie UpRoi1 z tym transkryptem, stabilizowane przez ProQ, korelowało ze wzrostem ekspresji flgL i większą ruchliwością bakterii. Może to sprzyjać przemieszczaniu się lizogennych komórek do środowiska korzystnego dla namnażania faga.

Praca nr 4 została opublikowana w 2026 w zestawieniu Methods in Molecular Microbiology cyklicznie publikowanym przez Springer Nature i zawiera opracowanie metody badania oddziaływań sRNA–mRNA. Opracowano interdyscyplinarną procedurę analizy wiązania małych sRNA z docelowymi transkryptami. Metoda łączy test różnicowej migracji kompleksów RNA w żelu poliakrylamidowym z pomiarami absorpcji promieniowania UV i spektroskopią dichroizmu kołowego. Takie podejście umożliwia ocenę występowania, siły i stabilności oddziaływań sRNA–mRNA.

Podsumowując, badania wykonane w ramach niniejszego projektu doktorskiego dostarczyły nowych danych na temat roli bardzo małych RNA regulatorowych w biologii bakteriofagów. Zidentyfikowano i scharakteryzowano dwie fagowe cząsteczki sRNA o przeciwnym działaniu: 24B_1, która sprzyja utrzymaniu lizogenii, oraz UpRoi1, która wspomaga przejście faga Φ 24B do cyklu litycznego. Szczególne znaczenie ma wykazanie, że tak krótkie cząsteczki RNA mogą jednocześnie regulować ekspresję genów fagowych i modyfikować funkcjonowanie komórki gospodarza, wpływając m.in. na jej metabolizm energetyczny oraz ruchliwość. Oryginalność tych badań polega nie tylko na funkcjonalnej charakterystyce pierwszego fagowego sRNA o rozmiarze odpowiadającym eukariotycznemu mikroRNA, lecz także na



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

przedstawieniu dwóch przeciwstawnych mechanizmów regulacyjnych, które wspólnie mogą uczestniczyć w precyzyjnym wyborze ścieżki rozwojowej faga. Wyniki wskazują zatem, że bardzo małe fagowe sRNA stanowią niedoceniane i niedostatecznie poznane czynniki regulacji interakcji fag–gospodarz. Co bardzo ciekawe, funkcjonalnie przypominając mechanizmy wykorzystujące mikroRNA u wirusów eukariotycznych. Przeprowadzone badania istotnie poszerzają wiedzę o regulacji cyklu życiowego fagów łagodnych i otwierają nowy kierunek badań nad znaczeniem krótkich RNA w biologii wirusów prokariotycznych. Mają one również potencjalne znaczenie praktyczne: poznanie mechanizmów stabilizujących lizogenię lub uruchamiających rozwój lityczny fagów Stx może w przyszłości stworzyć podstawę do opracowania strategii ograniczających indukcję profaga, a tym samym produkcję i uwalnianie toksyny Shiga podczas zakażeń STEC.

Do przedstawionej rozprawy wnoszę następujące pytania:

1. Proszę o zdefiniowanie celu rozprawy i przedstawienie hipotez badawczych, które postawiła sobie Doktorantka realizując swój projekt doktorski
2. Proszę o rozwinięcie, zgodnie z najlepszą wiedzą Doktorantki, jakie mechanizmy molekularne mogą decydować o przeciwstawnym wpływie cząsteczek 24B_1 i UpRoi1 na wybór między lizogeniczną a lityczną ścieżką rozwoju faga Φ 24B?
3. Proszę o rozwinięcie zagadnienia dotyczącego poziomów 24B_1 i UpRoi1 - czy należy rozumieć, że cząstki te regulują się wzajemnie i tworzą wspólny układ kontrolujący cykl życiowy faga?
4. Czy zdaniem Doktorantki te dwie cząsteczki to wyjątek, czy raczej „czubek góry lodowej” i należy się spodziewać, że badany bakteriofag posiada ich więcej? Czego należy oczekiwać w odległych ewolucyjnie bakteriofagach?
5. Chciałabym prosić Doktorantkę o zaproponowanie w jaki konkretnie sposób można byłoby wykorzystać wyniki jej prac w nowych rozwiązaniach medycznych, chroniących chorych przed skutkami zakażeń STEC?



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKI HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Podsumowanie

Po wnikliwej ocenie przedstawionej rozprawy stwierdzam, że zakres przeprowadzonych badań oraz uzyskane wyniki zdecydowanie spełniają wymagania stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.). Przeprowadzone badania świadczą o dobrych kompetencjach Doktorantki w zakresie pracy laboratoryjnej, jak i rozumowania naukowego. Stwierdzam, że Doktorantka zrealizowała interesujący i innowacyjny projekt badawczy, wnoszący oryginalny wkład do reprezentowanej dyscypliny. Rozprawa została napisana w sposób zrozumiały i staranny. Spełnia ona wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Natalii Lewandowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich wysoki poziom naukowy, istotne znaczenie i oryginalność, a także imponujący dorobek publikacyjny związany z ocenianą rozprawą, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej. Szczegółowo, wniosek powyższy opieram na tym, że Doktorantka wykryła i wykazała wiązanie mRNA genu z cząsteczką sRNA 24B_1, potwierdziła wiązanie się białka ProQ do kompleksu sRNA-mRNA, a także zbadała wpływ UpRoi1 na wzrost bakterii i ruchliwość oraz amplifikację fagów, w tym w procesie wymuszonej indukcji profaga, co pozwoliło na pozyskanie unikalnych obserwacji dotyczących regulatorowych aspektów badanych zjawisk.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
kierownik
LABORATORIUM BIOLOGII
MOLEKULARNEJ BAKTERIOFAGÓW
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

