



Poznań, 18.08.2026

Prof. UAM dr hab. Andrzej Pacak
Zakład Ekspresji Genów
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Lewandowskiej

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie czterech artykułów naukowych pod wspólnym tytułem:

Rola małych, niekodujących cząsteczek RNA w regulacji rozwoju bakteriofaga $\Phi 24_B$ oraz jego gospodarza, bakterii *Escherichia coli* produkującej toksynę Shiga.

Rozprawa dotyczy badania interakcji pomiędzy bakteriofagami a bakteriami, w których uczestniczą małe RNA pochodzenia bakteriofagowego. O tym jak ważne są tego typu badania świadczy fakt, że tego typu badania doprowadziły do odkrycia systemu immunologicznego bakterii zwanego jako CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated), a to z kolei doprowadziło do powstania narzędzia CRISPR/Cas9 wykorzystywanego obecnie szeroko do edycji genomów wielu organizmów, czy też linii komórkowych.

Same bakteriofagi uważane są za najliczniejsze byty biologiczne na ziemi. Tym bardziej ważne jest, aby zbadać te wirusy, gdyż z jednej strony mogą one być skutecznym narzędziem w zwalczaniu chorobotwórczych bakterii, z drugiej zaś mogą indukować produkcję toksycznych białek takich jak toksyna Shiga, a tym samym być źródłem poważnych czynników chorobowych. Sam fag $\Phi 24_B$ należy do wirusów, które niosą geny kodujące białkową toksynę Shiga. Jest on odpowiedzialny za infekowanie bakterii *Escherichia coli*. Geny kodujące białkową toksynę Shiga (*stx1*, *stx2*) bakterie otrzymały od fagów, które w cyklu lizogenicznym wprowadziły je do genomu bakterii (fagi Stx - Shiga toxin-converting bacteriophage). Stąd bakterie *E. coli* zdolne do wytworzenia toksyny Shiga nazywane są skrótem STEC (Shiga Toxin-producing *E. Coli*). W przypadku zaistnienia czynników środowiskowych takich jak niskie pH, brak jonów żelaza (dla genów *stx1*, działanie niezależne od indukcji cyklu litycznego), obecność niektórych antybiotyków, czy też obecność nadtlenu wodoru dochodzi do aktywacji cyklu litycznego, który prowadzi do



produkcji cząstek fagowych, toksycznych białek Shiga, zniszczenia bakterii i w konsekwencji prowadzi do poważnych problemów zdrowotnych u ludzi zarażonych bakteriami niosącymi geny kodujące toksynę Shiga. Jak wspomniałem wyżej niektóre antybiotyki mogą wywołać indukcję wycięcia profaga z genomu bakterii i doprowadzić w rezultacie do produkcji niezwykle silnej toksyny Shiga. Powoduje to, że typowa kuracja antybiotykowa w przypadku bakterii *E. coli* STEC może przynieść niepożądane skutki związane ze szkodliwym działaniem toksyny Shiga. Badania związane z zatrzymaniem profaga $\Phi 24_B$ w fazie lizogenicznej moim zdaniem są niezwykle ważne.

Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pań: dr hab. Bożeny Nejman-Faleńczyk, prof. UG (promotor) i dr Sylwii Bloch (promotor pomocniczy) w Katedrze Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii, na Uniwersytecie Gdańskim. Praca powstała w oparciu o finansowanie zapewnione z dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki: SONATA BIS 8, kierownik projektu: dr hab. Bożena Nejman-Faleńczyk, prof. Uniwersytetu Gdańskiego i OPUS 15, kierownik projektu: prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn.

Przedstawiony cykl prac tworzących rozprawę doktorską składa się z czterech artykułów naukowych:

A1. Lewandowska, N., Bloch, S., Łukasiak, A., Wesołowski, W., Węgrzyn, G., Nejman-Faleńczyk, B. (2025) The role of bacteriophage-derived small RNA molecules in bacterial and phage interactions. *Viruses*, 17(6), 834;

A2. Bloch, S., Lewandowska, N., Zwolenkiewicz, J., Mach, P., Łukasiak, A., Olejniczak, M., Donaldson, L. W., Węgrzyn, G., Nejman-Faleńczyk, B. (2023) Bacteriophage-encoded 24B_1 molecule resembles herpesviral microRNAs and plays a crucial role in the development of both the virus and its host. *Plos One*, 18(12), e0296038;

A3. Bloch, S., Lewandowska, N., Zwolenkiewicz-Nowak, J., Mazur, M., Chylewska, A., Dąbrowska, A. M., Musiał, N., Czaplewska, P., Wesołowski, W., Łukasiak, A., Ferenc, M., Pietrzycki, M., Węglińska, E., Mach, P., Węgrzyn, G., Olejniczak, M., Nejman-Faleńczyk, B. (2026) UpRoil - the phage-derived microRNA-size non-coding RNA molecule regulating both phage and its bacterial host development. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1869(1), 195135;

A4. Lewandowska, N., Bloch, S., Chylewska, A., Dąbrowska, A. M., Mazur, M., Zwolenkiewicz, J., Wesołowski, W., Łukasiak, A., Węglińska, E., Olejniczak, M., Węgrzyn, G., Nejman-Faleńczyk, B. (2026) Application of ultraviolet (UV) and circular dichroism (CD) spectroscopies to study RNA-RNA interactions of regulatory RNAs of bacteriophage origin. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 3004, 123–136.

W dwóch publikacjach **A1, A4** doktorantka jest pierwszym autorem, w dwóch kolejnych **A2, A3** jest drugim autorem, zaś pierwszym jest Pani dr Sylwia Bloch, promotor pomocniczy. W przypadku prac **A2 i A3** Pani mgr Natalia Lewandowska jest autorem równorzędnym z pierwszą autorką.

Przedstawiony cykl czterech publikacji jest bardzo dobrze dobrany i zrównoważony. Pierwsza praca **A1** jest pracą przeglądową, co niejako stanowi obszerny wstęp i wprowadzenie do prowadzonych badań i może być uznana za wstęp w typowej pracy

doktorskiej. Opisane zostały w niej bakteriofagi, ich rozwój, proces infekcji i sposoby regulacji procesu infekcji komórek bakteryjnych, relacje pomiędzy małymi/krótkimi RNA (sRNA) a docelowymi mRNA (bardzo dobry rysunek 1). Co ważne zostały w tej pracy opisane małe RNA pochodzenia fagowego, które wpływają na rozwój zarówno fagów jak i komórek gospodarza, w tym mały RNA, sRNA 24B_1. Bardzo dobrze została przedstawiona charakterystyka małych RNA pochodzenia fagowego, zaś podsumowanie informacji o małych RNA pochodzenia fagowego znajduje się w Tabeli 1, gdzie umieszczono podstawowe informacje o długości, sposobie działania wraz z odnośnikami literaturowymi dla 23 sRNA.

Z przedstawionych oświadczeń autorów publikacji oraz z informacji zawartych w samej publikacji wynika, że doktorantka miała istotny wpływ w przygotowanie publikacji. Brała udział w tworzeniu koncepcji samego artykułu i w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów, analizie zebranych danych, wykonaniu Tabeli 1. Opracowanie tej Tabeli 1 pokazuje umiejętność syntetycznego myślenia, analizy danych i umiejętności ich prezentacji w bardzo przejrzysty i czytelny sposób.

Druga praca **A2** ma charakter eksperymentalny. Jest to praca nowatorska, nie tylko w Polsce, ale i szerzej na świecie. Przygotowując recenzję przeszukałem dostępną literaturę dotyczącą małych RNA pochodzenia bakteriofagowego i ich wpływie na produkcję toksyny Shiga. Okazało się, że w bazie danych PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov) po wpisaniu wyrażenia: small RNA AND bacteriophages AND Shiga, otrzymałem pięć publikacji:

1. Bloch S, **Lewandowska N**, Zwolenkiewicz-Nowak J, Mazur M, Chylewska A, Dąbrowska AM, Musiał N, Czaplewska P, Wesołowski W, Łukasiak A, Ferenc M, Pietrzycki M, Węglińska E, Mach P, Węgrzyn G, Olejniczak M, Nejman-Faleńczyk B. UpRoil - the phage-derived microRNA-size non-coding RNA molecule regulating both phage and its bacterial host development. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2026 Mar;1869(1):195135. doi: 10.1016/j.bbagr.2026.195135. Epub 2026 Jan 12. PMID: 41534697.
2. Ma R, Tang S, Zeng J, Wei Y, Li X, Wang X. Targeting STEC-induced edema disease in weaned piglets: prophylactic oral phage P-GXEC-L2P5 attenuates bacterial colonization, toxin production, and endothelial damage. *Vet Res.* 2025 Dec 17;57(1):13. doi: 10.1186/s13567-025-01683-w. PMID: 41408336; PMCID: PMC12822307.
3. Bloch S, **Lewandowska N**, Zwolenkiewicz J, Mach P, Łukasiak A, Olejniczak M, Donaldson LW, Węgrzyn G, Nejman-Faleńczyk B. Bacteriophage-encoded 24B_1 molecule resembles herpesviral microRNAs and plays a crucial role in the development of both the virus and its host. *PLoS One.* 2023 Dec 20;18(12):e0296038. doi: 10.1371/journal.pone.0296038. PMID: 38117844; PMCID: PMC10732415.
4. Sy BM, Lan R, Tree JJ. Early termination of the Shiga toxin transcript generates a regulatory small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Oct 6;117(40):25055-25065. doi: 10.1073/pnas.2006730117. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32968018; PMCID: PMC7547250.
5. Nejman-Faleńczyk B, Bloch S, Licznarska K, Dydecka A, Felczykowska A, Topka G, Węgrzyn A, Węgrzyn G. A small, microRNA-size, ribonucleic acid regulating gene expression and development of Shiga toxin-converting bacteriophage Φ 24B. *Sci Rep.*

2015 May 11;5:10080. doi: 10.1038/srep10080. PMID: 25962117; PMCID: PMC4426718.

W dwóch z tych publikacji: nr 1 (A3 w rozprawie doktorskiej) i nr 3 (A2 w rozprawie doktorskiej) Pani mgr Natalia Lewandowska jest współautorem. Powyższe zestawienie pokazuje, jak nowatorskim, unikalnym i niezwykle ważnym tematem badawczym zajmuje się Pani mgr Natalia Lewandowska.

W samej publikacji A2 zostały umieszczone wykonane analizy małego/krótkiego RNA (sRNA 24B_1) bakteriofaga Φ 24B, który przypomina mikroRNA występujący w sekwencjach herpeswirusów i, który wpływa na rozwój zarówno bakteriofaga jak i zakażonej bakterii. Sama dojrzała cząsteczka ma 20 nt i powstaje z prekursora o długości 81 nt (80 nt?). Prekursor ten, a nie dojrzała cząsteczka wiąże się do bakteryjnego białka Hfq. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że obecność dojrzałej cząsteczki 24B_1 prowadzi do cyklu lizogenicznego, czyli nie prowadzi do zniszczenia zainfekowanej komórki bakteryjnej. W przypadku samej zaś bakterii-gospodarza sRNA wiąże się do mRNA kodującego podjednostkę dehydrogenazy bursztynianowej (sdhB), wpływając na produkcję fumaranu, NADH, ATP. Muszę przyznać, że praca bardzo mi się podoba. W szczególności na uznanie zasługuje identyfikacja potencjalnego, bakteryjnego mRNA, rozpoznawanego przez sRNA. Wykonana analiza metabolomu pokazała zwiększony poziom NAD^+ i zmniejszony poziom fumaranu u bakterii *E. coli* niosących plazmid pUC18 zawierający sekwencję cząsteczki 24B_1, po 6 godzinach trwania eksperymentu, rysunek 7. Jest to świetny przykład jak można na podstawie zmian poziomu jednego lub więcej związków zidentyfikować funkcję innej cząsteczki. Co istotne Pani mgr Natalia Lewandowska oprócz bardzo ważnych analiz takich jak analizy wewnątrzkomórkowego rozwoju faga Φ 24B, czy też pomiarów kinetyki lizy komórek gospodarza, brała udział w przygotowaniu prób do analizy metabolomu przy wykorzystaniu metody NMR. To pokazuje zdolność doktorantki do nauki i wykorzystania nowych metod badawczych, które w istotny sposób wpłynęły na określenie funkcji badanego małego RNA 24B_1.

W trzeciej pracy A3 (z roku 2026) zbadano kolejną cząsteczkę sRNA tj. UpRoi1 pod kątem jej wpływu na rozwój faga jak i rozwój gospodarza – *E. coli*. Praca ta podobnie jak praca A2 ma bardzo nowatorski charakter. Świadczy o tym fakt, że sama cząsteczka sRNA UpRoi1 nie została opisana w publikacji A1 (z roku 2025) i nie ma jej w Tabeli 1. Wykonane analizy pokazały, że 30 nt cząsteczka sRNA UpRoi1 wiąże się zarówno do fagowego 5' UTR mRNA kodującego antyrepresor Roi jak i bakteryjnego mRNA *flgL*. W tym ostatnim przypadku sRNA kontroluje bakteryjny gen związany z poruszaniem się bakterii. W przypadku tej pracy na uznanie zasługuje dobór autorów, a tym samym na wykorzystanie szeregu nowoczesnych i wzajemnie się uzupełniających technik eksperymentalnych. W szczególności na uwagę zasługuje wykorzystanie dichroizmu kołowego do analizy oddziaływań pomiędzy sRNA UpRoi1 i 5' UTR mRNA Roi, rysunek 3E. Jak wynika z oświadczenia Pani mgr Natalii Lewandowskiej wykonała ona m.in. syntezę *in vitro* oraz oczyściła sRNA jak i docelowy mRNA wykorzystany właśnie w pomiarach metodą dichroizmu kołowego wykonanych przez Panią Aleksandrę Dąbrowską. Świetnym podejściem było także wykonanie analizy ruchliwości bakterii (motility assay, rysunek 8),



który pokazał istotny wpływ sRNA UpRoi1 na zwiększenie obszaru ruchliwości (motility zone) z 4,36 cm (bez produkcji sRNA) do 4,85 cm (transkrypcja sRNA z wykorzystaniem promotora pN znajdującego się w plazmidzie pBAD24, wynik, którego do końca nie rozumiem). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że sRNA UpRoi1 promuje lityczny rozwój faga $\Phi 24_B$.

W czwartej publikacji **A4** doktorantka wraz z pozostałymi autorami opisała metody wykorzystania spektroskopii UV oraz pomiaru dichroizmu kołowego do analizy oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA. Fakt publikacji w ramach serii *Methods in Molecular Biology* świadczy o uznaniu na skalę światową zespołu w skład, którego wchodzi Pani mgr Natalia Lewandowska, w obszarze badań oddziaływań pomiędzy cząsteczkami RNA. Co bardzo ważne przedstawione protokoły mają ważny aspekt metodyczny jak i dydaktyczny, gdyż pozwalają innym naukowcom oraz studentom na wykorzystanie w swoich badaniach nowych, dotychczas nieużywanych metod badawczych. Taka działalność dydaktyczna jest bardzo ważna dla pracowników Uniwersytetu.

We wszystkich wymienionych publikacjach Pani mgr Natalia Lewandowska miała istotny udział zarówno koncepcyjny, merytoryczny jak i edytorski. Potwierdzają to załączone oświadczenia autorów publikacji. Wykonane badania zawarte w publikacjach **A2** i **A3** mają nowatorski i oryginalny charakter. Dwie prace: **A1** – przeglądowa i **A4** – metodologiczna są autorskim opracowaniem zespołów, których członkiem była Pani mgr Natalia Lewandowska.

Resumując na podstawie przedstawionych w cyklu publikacji informacji, analiz dotyczących roli małych RNA w rozwoju bakteriofaga jak i bakterii – gospodarza, mogę jednoznacznie stwierdzać, że takie małe RNA jak sRNA 24B_1 oraz sRNA UpRoi1 wpływają na rozwój bakteriofaga jak i komórek gospodarza. Dodatkowo cząsteczka sRNA 24B_1 hamuje aktywację profaga, która jest kluczowa w produkcji toksyny Shiga. Daje to nadzieje na przygotowanie środka terapeutycznego opartego o sekwencję małego RNA sRNA 24B_1.

Biorąc pod uwagę, że cykl prac został już opublikowany i w przypadku prac **A1**, **A2**, **A3** były one recenzowane, zaś w przypadku pracy **A4** korygowana przez edytora, w swojej recenzji chciałbym stwierdzić, że przedstawiony cykl publikacji, udział doktorantki w ich powstaniu jest zupełnie wystarczający, aby móc ubiegać się o stopień doktora.

Moja recenzja przedstawionego cyklu publikacji w ramach rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Lewandowskiej **jest pozytywna**. Ponieważ częścią procedury nadania stopnia doktora jest publiczna obrona zatem prosiłbym doktorantkę, aby w trakcie obrony, o odniesienie się do kwestii dotyczących samych cząsteczek sRNA, 24B_1 i UpRoi1.

1. Czy struktura prekursora RNA 24B_1 rzeczywiście przypomina strukturę pre-mikroRNA występującą w organizmach eukariotycznych (roślinnych, zwierzęcych)? Przedstawiona struktura w pracy **A2**, rysunek 8, sugeruje brak możliwości wycięcia dupleksu mikroRNA/mikroRNA*. Sam zaś potencjalny mikroRNA znajduje się w pętli struktury prekursora.

2. Na ile struktura prekursora RNA 24B_1 jest podobna do struktur prekursorów mikroRNA występujących u herpeswirusów.



Czy położenie sekwencji potencjalnego mikroRNA, sRNA 24B_1 jest w tym samym regionie prekursora, co w przypadku herpeswirusów?

3. W pracy A3 opisano sRNA UpRoi1 jako podobny do mikroRNA, czy znane są doktorantce funkcjonalne mikroRNA o długości 30 nt?

4. Biorąc pod uwagę, że u bakterii brak jest białek odpowiedzialnych za dojrzewanie typowych eukariotycznych mikroRNA tj. białek Drosha, Dicer lub DCL1 (Dicer-like 1 u roślin), bądź białek Ago1 biorących udział u roślin w rozcinaniu docelowego mRNA, jakie białka podobne do tych wymienionych białek mogą brać udział w dojrzewaniu cząsteczki sRNA 24B_1? Czy białko Hfq jest podobne do wymienionych powyżej białek?

5. Czy doktorantka przeprowadziła analizy eksperymentalne (5' RACE, analiza PARE – Parallel Analysis of RNA Ends), które pozwoliłyby na określenie jak działa cząsteczka 24B_1 na docelowy mRNA *sdhB*, czy jest to udział w rozcinaniu docelowego mRNA, blokowanie translacji?

6. Jak otrzymane wyniki wykorzystałby Pani do skutecznej terapii skierowanej przeciwko szkodliwemu działaniu toksyny Shiga? Małe RNA sRNA StxS (Tabela 1, A1)?

Oprócz przedstawionego cyklu czterech prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalia Lewandowska jest współautorką kolejnych siedmiu prac opublikowanych w takich czasopismach jak *Journal of Applied Genetics*, *Nucleic Acids Research*, *Plasmid*, *Virology*, *Viruses*. Jest to naprawdę duża liczba jak na ten etap rozwoju naukowego i świadczy z jednej strony o dużej pracowitości doktorantki, z drugiej o uznaniu jej umiejętności przez innych współpracowników/inne współpracowniczki. Pani mgr Natalia Lewandowska miała jedno wystąpienie ustne i sześć prezentacji posterowych przedstawionych w trakcie konferencji krajowych. Otrzymała Nagrodę "Srebrnej Ezy" za zajęcie II miejsca, za wystąpienie posterowe, odbyła dwa staże naukowe i była wykonawcą w czterech grantach. Zabrakło mi wystąpień na konferencjach zagranicznych oraz grantów, projektów typu Preludium realizowanych przez doktorantkę jako kierownik danego projektu.

Biorąc pod uwagę **moją pozytywną recenzję** rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Lewandowskiej stwierdzam, że osiągnięcie naukowe Pani mgr Natalii Lewandowskiej spełnia kryteria określone w art. 187 ust. 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm). Przedstawione oświadczenia dotyczące udziału poszczególnych autorów w tworzeniu publikacji pozwala mi stwierdzić, że Pani mgr Natalia Lewandowska ma dużą ogólną wiedzę teoretyczną i potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe. Cykl publikacji stanowi bardzo ważny i oryginalny wkład w zrozumienie roli małych RNA w procesie rozwoju bakteriofagów i ich gospodarzy.

Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom przedstawionych publikacji tworzących rozprawę doktorską, ich nowatorski charakter, możliwości wykorzystania badań do blokowania produkcji toksyny Shiga oraz istotnego udziału Pani mgr Natalii Lewandowskiej, wykraczającego moim zdaniem ponad typową pracę doktorską, w tym w szczególności:



1. Przygotowanie Tabeli 1 zamieszczonej w publikacji **A1**, zawierającej i przedstawionej w czytelny sposób informacje o małych RNA pochodzenia bakteriofagowego;
2. Wykonanie prac, wymagających dodatkowego przeszkolenia, dociekliwości, tj. przygotowania prób do analizy NMR w pracy **A2** i RNA wykorzystanego do pomiarów dichroizmu kołowego w pracy **A3**, wnioskuje o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Lewandowskiej.

Zwracam do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne, Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Lewandowskiej do dalszych etapów postępowania związanych z jej wnioskiem o nadanie jej stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

z poważaniem
Andrzej Pacak