



Wrocław, 04.12.2014

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Jakuba Pawelczyka

pt.: „Rola białka AccD6 jako karboksylotransferazy aktywnej w biosyntezie kwasów mykolinowych prątków wolno i szybko rosnących”

Narastająca oporność szczepów *Mycobacterium tuberculosis* na dotychczas stosowane antybiotyki stymuluje naukowców do poszukiwania nowych celów dla terapii antybiotykowej. Ściana komórkowa prątków odgrywa kluczową rolę w przeżywalności tych bakterii, a niektóre z jej składników, np. kwasy mikołowe są swoiste tylko dla bakterii z podrzędu *Corynebacterineae*, do których należą prątki *Mycobacterium*. A zatem wydaje się zasadnym poszukiwanie nowych celów dla leków przeciwgruźliczych wśród enzymów uczestniczących w syntezie ściany komórkowej. Wskazanie określonego enzymu jako potencjalnego celu dla antybiotyku musi być poprzedzone intensywnymi badaniami genetycznymi oraz analizą na poziomie molekularnym. W pracy przedstawionej mi do recenzji jako obiekt badań wybrano białko AccD6, podjednostkę karboksylazy acetylo-CoA, która uczestniczy w procesie biosyntezy kwasów mikołowych. Tak więc praca ta wpisuje się w najnowszy nurt badań zmierzających do identyfikacji oraz charakterystyki nowych celów dla leków przeciwgruźliczych. Należy podkreślić, że praca ta jest kontynuacją intensywnych badań zespołu prof. Jarosława Dziadka nad ścianą komórkową prątków. Nie można przemilczeć faktu, że prątki, a zwłaszcza *M. tuberculosis*, są trudnym obiektem badań i wymagają od eksperymentatora dużej cierpliwości.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ przyjęty dla tego typu opracowań. Na uwagę zasługuje przede wszystkim estetyczna szata graficzna. Natomiast liczba pozostawionych pustych stron jest nadmierna, co powoduje, że praca liczy ponad 300 stron! We „Wstępie” Autor, wykazując się znakomitą znajomością tematu, przedstawił strukturę, syntezę oraz funkcje

biologiczne kwasów mikołowych bakterii rodzaju *Mycobacterium*. Ostatnią część „Wstępu” Doktorant poświęcił charakterystyce karboksylotransferaz. „Wstęp” stanowi doskonałe kompendium wiedzy na temat kwasów mikołowych oraz enzymów (zwłaszcza karboksylotransferaz) uczestniczących w syntezie tych kwasów. Dobór i selekcja materiału do tego rozdziału zostały dobrze przemyślane. Należy podkreślić, że Doktorant zdobył już doświadczenie w pisaniu tego rodzaju opracowań ponieważ jest współautorem rozdziału zatytułowanego „The molecular genetics of mycolic acid biosynthesis” zamieszczonego w książce wydanej przez American Society of Microbiology.

Cel pracy został jasno i krótko, ale niestety mało „atrakcyjnie” sformułowany. Celem recenzowanego doktoratu było przecież coś więcej niż „tylko” potwierdzenie funkcji białka AccD6.

Rozdział „Materiały i Metody” przedstawia prawidłowy opis zarówno używanych materiałów biologicznych (szczepy bakteryjne), podłoży hodowlanych, stosowanych technik doświadczalnych.

Doktorant przedstawił wyniki bardzo starannie i szczegółowo. Czasami wydaje się, że może zbyt szczegółowo, zwłaszcza dotyczy to tych opisów wyników, które zostały zawarte w już opublikowanej pracy (J. Bacteriol., 2011) pt. „AccD6, a key carboxyl-transferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain”, a której Doktorant jest pierwszym autorem. A zatem znacząca część wyników (i wniosków z nich płynących) została już oceniona przez niezależnych recenzentów, specjalistów zajmujących się ścianą komórkową prątków – co częściowo zwalnia recenzenta pracy doktorskiej ze szczegółowej oceny wyników. Poszczególne podrozdziały „Wyników” zatytułowane są w formie „zgrabnych” wniosków podobnie jak ma to miejsce we wspomnianej publikacji. Cennym uzupełnieniem rozdziału „Wyniki” jest podrozdział dotyczący identyfikacji alternatywnego szlaku karboksylacji acetylo-CoA w komórkach *M. smegmatis*. Wyniki przedstawione w tej części doktoratu (dotychczas nie opublikowane) uzupełniły i usystematyzowały wiedzę na temat udziału poszczególnych białek z rodziny AccD w biosyntezie kwasów mikołowych u *M. smegmatis*.

W rozdziale końcowym szczegółowo i wyczerpująco (ponad 20 stron) omówiono uzyskane wyniki oraz przedyskutowano je na tle literatury przedmiotu. Doktorant w sposób krytyczny analizuje własne wyniki. Autor w sposób interesujący przedstawia ewolucję poglądów na temat funkcji karboksylotransferaz prątków, począwszy od roku 2006 kiedy to zespół Tsai w pracy opublikowanej w PNAS USA napisał „The substrate specificity of AccD1–6 has been an unsolved mystery...”

Reasumując, dzięki wynikom przedstawionym w doktoracie stan wiedzy na temat poszczególnych karboksylotransferaz AccD (i ich roli) znacząco się zwiększył a za najważniejsze osiągnięcia Doktoranta uważam:

1. Wykazanie, że u prątków gen *accD6* koduje funkcjonalną podjednostkę karboksylazy acetylo-CoA, która katalizuje reakcję syntezy malonylo-CoA.
2. Wykazanie, że u *M. tuberculosis* gen *accD6* jest niezbędny.

Ten drugi wniosek/osiągnięcie stanowi podstawę do badań zmierzających do zaprojektowania swoistego inhibitora podjednostki karboksylazy acetylo-CoA.

Dodatkowo chciałabym podzielić się kilkoma uwagami czy wątpliwościami i prosić Doktoranta o ustosunkowanie się do nich:

1. Dodatkowy promotor P_{acc} genu *accD6* został zidentyfikowany tylko u *M. tuberculosis*, natomiast nie występuje on u *M. smegmatis*. Czy Autor uważa, że jest to cecha prątków wolnorosnących i jaka może być biologiczna rola tego „dodatkowego” promotora? Proszę zaproponować metody umożliwiające precyzyjne zmapowanie miejsca startu transkrypcji z tego promotora oraz wykazanie jego aktywności w komórkach prątka.
2. W jaki sposób Autor zaprojektowałby inhibitor podjednostki karboksylazy acetylo-CoA?
3. Autor w rozprawie doktorskiej stosuje nazwę kwasy mykolinowe natomiast zespół prof. Jarosława Dziadka używa głównie nazwy kwasy mikolowe. Chciałabym dowiedzieć u źródła, która nazwa jest obowiązująca/prawidłowa.

Zauważałam drobne błędy językowe, przykładowo: zamienne stosowanie słów liczba/ilość, „...funkcje barierowe...”, „...segment górny ściany komórkowej skomponowany jest.....”. Podpisy poszczególnych elementów rysunku powinny być podane w j. polskim (np. na str. 32). Do rozdziału „Materiały i Metody” również wkradły się drobne błędy, np. w podrozdziale 4.10.8 na stronie 94 jest napisane „...bakteriezawieszano w 200 ml...” zamiast w 200 μ l. Ponadto nie ma sensu podawać w jakiej objętości zawieszano komórki, jeżeli nie wiadomo z ilu płytek zebrano bakterie (lub z jakiej objętości hodowli). Cytat Lin i wsp. pochodzi z pracy opublikowanej w 2006 roku a nie w 2005 i trochę został zmieniony.

Powyższe uwagi nie mają zasadniczego wpływu na wysoką ocenę rozprawy doktorskiej. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant jest nie tylko pierwszym autorem wspomnianej pracy z *J.*

Bacteriol., ale również jest współautorem w pięciu artykułach (w tym *J. Biol. Chem.*, *BMC Microbiology*, *J. Bacteriol.*) oraz jednego rozdziału do książki „Molecular Genetic of Mycobacteria” (ASM, 2014)

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgra Jakuba Pawelczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego i o wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Jolanta Zakrzewska-Czerwińska