



Prof. dr. hab Anna Pawlik
tel. 071-3709949
e-mail: anna.pawlik@hirsztfeld.pl

Wrocław, 03.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Zygaty-Pytlos
pt.: „Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych do optymalizacji inhibitorów gyrazy
***Mycobacterium tuberculosis*”**

Rozprawa doktorska mgr Darii Zygaty-Pytlos przedstawia wyniki badań zmierzających do opracowania metodologii identyfikacji regionów białek kluczowych dla wrażliwości lub oporności na antybiotyki, opartej na wzorcowaniu ewolucyjnym wykorzystującym gyrazę *M. tuberculosis* jako modelowy cel molekularny terapii przeciwgruźliczej. Rozprawa doktorska została przygotowana pod opieką promotorki dr hab. Anny Brzostek, w ramach projektu naukowego Sonata BIS 9 kierowanego przez dr Alinę Minias. Zespół, w którym badania prowadziła Doktorantka, specjalizuje się m.in. w badaniach biologii *M. tuberculosis* oraz poszukuje nowych celów terapii oraz związków antybiotycznych przeciwko tej bakterii, co ma znaczenie dla wsparcia naukowego, na które mogła liczyć Doktorantka.

Zakażenia prątkami gruźlicy mają charakter globalny, rosnący w wielu regionach świata, trudny do opanowania ze względu na migrację ludności oraz rosnącą lekooporność szczepów *M. tuberculosis*, w tym wielolekooporność indukowaną stosowaniem antybiotyków. W konsekwencji, jak wskazują dane Światowej Organizacji Zdrowia, gruźlica jest główną przyczyną zgonów spowodowanych przez pojedynczy czynnik zakaźny oraz znajduje się wśród 10 najczęstszych przyczyn zgonów. **Dlatego badania naukowe mgr Zygaty-Pytlos wpisują się w aktualny trend badań prowadzonych na świecie.** Zmierzających do wyjaśnienia mechanizmów obserwowanej lekooporności, opracowania nowych metod projektowania leków, wskazania nowych celów molekularnych działania antybiotyków oraz identyfikacji nowych antybiotyków.

Rozprawa doktorska mgr Zygaty-Pytlos ma formę monografii. Zawiera wszystkie elementy konieczne do jej rzetelnej oceny, w tym oceny aspektów wskazanych jako koniecznych do nadania stopnia doktora w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tj., **1/** prezentowania ogólnej wiedzy Doktorantki, **2/** wykazania umiejętności Doktorantki do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz **3/** wskazania na to, czy samodzielnie rozwiązała problem naukowy.

Ad 1. Doktorantka we wstępie swojej pracy zwięźle przedstawiła zagadnienia związane z epidemiologią zakażeń *M. tuberculosis*, mechanizmami oporności na antybiotyki, oraz, bardziej szczegółowo opisała gyrazę jako molekularny cel terapii przeciwgruźliczej, który jest głównym tematem jej badań. Scharakteryzowała również wybrane zagadnienia ewolucyjne, co jest istotne dla zrozumienia hipotezy badawczej oraz badań doktorskich. W rozdziale Materiały i metody doktorantka dokładnie i logicznie opisuje procedury i protokoły zastosowane w badaniach, a także wykazuje wykorzystane odczynniki, plazmidy i oligonukleotydy. Kompletność tego rozdziału świadczy o wiedzy metodologicznej i opanowaniu warsztatu badawczego. Rozdział Wyniki jest starannie przygotowany i przedstawia wyniki badań w sposób uporządkowany i czytelny. W rozdziale Dyskusja Doktorantka omawia wyniki swoich badań w szerszym kontekście dotychczasowej wiedzy, podkreślając swój wkład



w rozwój badań w zakresie biologii i zwalczania zakażeń *M. tuberculosis*, równocześnie zauważając ograniczenia swojej pracy. Rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem naukowym i opatrzona licznymi rysunkami i schematami ułatwiającymi śledzenie opisywanych zagadnień, zarówno w części teoretycznej pracy, metodycznej, jak i w wynikach. Doktorantka cytuje opublikowane prace adekwatne do opisywanych zagadnień. Nieliczne błędy językowe, merytoryczne czy określenia żargonowe nie przeszkadzają w czytaniu i zrozumieniu pracy. **Wymienione cechy pracy wskazują na to, że Doktorantka posiada ogólną wiedzę w zakresie biologii, w tym biologii molekularnej i medycznej, szczególnie w obszarze badań nad *M. tuberculosis*, którą potrafiła wykorzystać w pracy naukowej.**

Ad 2. Cel pracy doktorskiej został precyzyjnie określony, a badania naukowe były konsekwentnie i metodycznie realizowane. Doktorantka wykonała większość prac opisanych w rozprawie samodzielnie, a udział osób trzecich lub wyniki uzyskane poza jednostką macierzystą w ramach stażu zostały dodatkowo zaznaczone. Można dyskutować, czy wyniki bioinformatyczne uzyskane przez Doktorantkę w okresie pracy magisterskiej powinny być przywołane w pracy doktorskiej w formie cytowania, a nie opisywane, ale konwencja przyjęta w rozprawie pozwala na dokładniejszy opis analiz bioinformatycznych, które stanowią punkt wyjścia do pracy doktorskiej. Całość pracy jest spójna, logicznie zaprezentowana; najważniejsze aspekty są właściwie podkreślone, co wskazuje na to, że **Doktorantka potrafi samodzielnie prowadzić pracę naukową**, stosownie do etapu rozwoju naukowego.

Ad 3. Główna hipoteza pracy doktorskiej zakładała, że wykorzystując algorytmy ewolucyjne oraz bazy danych sekwencji genów, można wytypować kodony konserwatywne oraz kodony zmienne w genach istotnych dla komórki białek, które mogą wskazywać na regiony odpowiednio niezmiennie i kluczowe dla aktywności białek oraz przeżycia komórek, a także regiony podlegające zmianom, odpowiadające za rozwój oporności. W konsekwencji informacje można wykorzystać do projektowania związków hamujących aktywność białek, a także do diagnostyki zakażeń lekoopornych oraz do przeprojektowywania leków. Nie jest to całkowicie nowa hipoteza, a próby racjonalizacji projektowania leków trwają już od dawna, przy czym wykorzystuje się różne podejścia badawcze analizujące sekwencje białek, ich strukturę czy oddziaływania międzycząsteczkowe. Znaczenie takich racjonalnych podejść rośnie wraz z rozbudową baz danych i rozwojem narzędzi bioinformatycznych, w tym sztucznej inteligencji. Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała podjednostki *gyrA* i *gyrB* *M. tuberculosis* i przeprowadziła analizy ewolucyjne w celu wskazania kodonów konserwatywnych i zmiennych genów. Następnie, aby zweryfikować znaczenia wytypowanych kodonów dla aktywności gyrazy i oporności na antybiotyki, Doktorantka wykonała szereg badań *in vivo* i *in vitro* analizujących wpływ wytypowanych kodonów na wrażliwość/oporność *M. tuberculosis* oraz aktywność samej gyrazy. Aby przeprowadzić badania weryfikujące, Doktorantka przygotowała rozbudowany warsztat badawczy w postaci rekombinowanych szczepów w obrębie genów *gyrA/gyrB*, będących matrycą do dalszego wprowadzania mutacji punktowych w podjednostkach gyrazy; następnie przygotowała rozbudowany zestaw zmutowanych szczepów *M. tuberculosis* wykorzystywanych w porównawczych analizach fenotypowych wzrostu i wrażliwości/oporności na antybiotyki celujące w gyrazę. Do badań *in vitro* Doktorantka skonstruowała plazmidy do ekspresji rekombinowanych wariantów gyrazy i oczyściła wiele wariantów podjednostek GyrA i GyrB. Doktorantka następnie scharakteryzowała aktywność



wariantów gyrazy w testach wprowadzania superskrętów, dekatencji i linearyzacji DNA oraz w teście ATPazowym, w obecności lub przy braku antybiotyków, przy czym analizy i antybiotyki dobierane były racjonalnie w zależności od regionu białka, w którym zmieniony został kodon. Kończącym etapem pracy Doktorantki, prowadzonym we współpracy z dwoma ośrodkami naukowymi, było wykorzystanie sekwencji gyraz (form dzikich oraz wariantów o zmiennych i konserwatywnych kodonach), do identyfikacji nowych związków hamujących aktywność gyraz, a następnie analiza potencjalnej aktywności inhibitorowej wybranych zidentyfikowanych związków. W wyniku swoich badań Doktorantka wytypowała szereg kodonów konserwatywnych oraz zmiennych, zarówno znanych z udziału w indukowaniu antybiotykoodporności, które potwierdziły poprawność założeń i możliwości analizy, jak i nowych, dotychczas niewiązanych z antybiotykoodpornością. Doktorantka wykazała też znaczenie wybranych zidentyfikowanych kodonów dla aktywności gyrazy, w tym wrażliwości lub oporności na antybiotyki. Ponadto Doktorantka wytypowała nowe związki, które mogą hamować gyrazę, a działanie niektórych sprawdziła eksperymentalnie. Cztery z tych związków są obiecującymi kandydatami do dalszych badań nad ich potencjalnym wykorzystaniem w terapii przeciwgruźliczej. Wyniki uzyskane w pracy są dobrze opisane, logicznie przedstawione, zaprezentowane w postaci licznych rysunków, wykresów i tabel. W analizach stosowano odpowiednie kontrole, dlatego wyniki są wiarygodne i przekonujące. Wyniki rozprawy są nowatorskie, a Doktorantka kompleksowo i w sposób metodyczny potwierdziła tezę postawioną na początku swoich badań. **Dlatego rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego, a do najważniejszych osiągnięć należy zaliczyć:**

- wykazanie na przykładzie gyrazy *M. tuberculosis*, że zastosowane metody wzorcowania ewolucyjnego mogą być wykorzystane do wyjaśniania mechanizmów oporności i projektowania/poszukiwania nowych leków,
- zidentyfikowanie nieznanych dotychczas mutacji odpowiedzialnych za oporność na antybiotyki przeciwgruźlicze,
- zidentyfikowanie nowych związków o potencjale antybiotycznym w stosunku do *M. tuberculosis*,
- skonstruowanie szczepów rekombinowanych *M. tuberculosis* $\Delta gyrA/attB::gyrA$ i *M. tuberculosis* $\Delta gyrB/attB::gyrB$ jako narzędzi do badania aktywności gyraz *in vivo*.

Po zapoznaniu się z rozprawą nasunęły mi się następujące uwagi, pytania lub komentarze:

Materiały i metody:

Spis materiałów i opis metod zostały dobrze przygotowane, jednak niektóre warunki wydają się odbiegać od typowych:

- Rozdz. 3.5.3: w amplifikacji DNA stosowano 1 μ M stężenie starterów - wyższe niż producent zaleca i wyższe niż standardowo stosowane. Jeśli takie stosowano, to proszę o wyjaśnienie, z czego wynikała zmiana.
- Rozdz. 3.6.2 i 3.6.3: do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 10 ng RNA, a ilość cDNA używanego do reakcji qPCR mierzono, aby wziąć 10 ng cDNA. Zwykle używa się więcej RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji, a ilości cDNA po przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji się nie mierzy. Czym było podyktowane użycie stosunkowo małej ilości RNA



i dlaczego mierzono stężenie cDNA? W tym miejscu zapytam też, czy wykonano analizy wydajności starterów, aby można było zastosować podaną w pracy metodę analizy transkrypcji genów? Zauważę też, że w pracy nie podano sekwencji starterów *sigA* wykorzystywanych w reakcji RT-qPCR do powielenia kontrolnego genu.

- Rozdz. 3.7.3: w procedurze izolacji białek stosowano zarówno PMSF jak i koktajl inhibitorów? Zwykle koktajle inhibitorowe zawierają inhibitory proteaz serynowych (przy okazji tej uwagi dodam również, że brakuje istotnej informacji: co to był za koktajl).

Stężenia lub ilości wykorzystywane w reakcjach powinny być jednoznacznie definiowane; w pracy natomiast wkrada się zamieszanie, czasem przez doprecyzowanie; np.. Rozdz. 3.8.2 str. 89: „3 μ l enzymu o stężeniu odpowiadającemu 10 U” albo rozdz. 3.8.1 „3 μ l enzymu o stężeniu odpowiadającemu 10 U (1U w mieszaninie reakcyjnej)”. W tym ostatnim przypadku objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 30 μ l, to ile enzymu dodano? Może lepiej w takich sytuacjach zdefiniować jednostkę enzymatyczną (co ma miejsce w pracy) i posługiwać się stężeniem wyrażonym w jednostkach aktywności na jednostkę objętości (np. U/ml).

Zwracam też uwagę na to, że niektóre szczegóły analiz, czasem oczywiste dla eksperymentatora, są istotne dla uzyskanych wyników, a wiedza o nich jest konieczna, aby powtórzyć eksperyment z podobnym wynikiem w innym laboratorium. W pracy w niektórych opisach zabrakło tych szczegółowych danych technicznych, jak np. w Rozdz. 3.3.3 nie podano informacji o kuwetach stosowanych do elektroporacji *M. tuberculosis* (w tym wypadku rozmiar szczeliny jest istotny), a w Rozdz. 3.7.7 nie wspomniano o rodzaju kapilar wykorzystywanych w analizie stabilności termicznej białek (istnieją dwa typy, których parametry mogą znacząco wpływać na wyniki). Warto o tym pamiętać, przygotowując publikację.

Wyniki:

Znakomita większość wyników jest bardzo dobrze udokumentowana; moją wątpliwość wzbudziła jednak interpretacja analizy tworzenia heterokompleksów GyrAGyrB (Rozdział 4.4.2.4 i Ryc. 4.33). Białka GyrA i GyrB migrują bardzo podobnie w żelu; w takim wypadku drobne zaburzenia migracji lub zmiany konformacji białek na skutek modyfikacji (np. nieodwracalnych utlenień na złożu niklowym) mogą wpływać na interpretację wyników i dlatego należałoby zastosować inne metody detekcji białek w kompleksach (np. immunoblotting). W kompleksach związanych do złoża i eluowanych imidazolem stechiometria GyrA:GyrB jest daleka od 1:1 (śladowe ilości GyrA związały się z GyrB, również w przypadku wariantów natywnych). Kontrola specyficzności wiązania GyrA wskazuje na to, że białko nie oddziałuje ze złożem, ale jednak tak słabe współoczystczenie z GyrB może sugerować niespecyficzne oddziaływania GyrA z dowolnym białkiem związanym ze złożem. Moim zdaniem, trudno jest wnioskować jednoznacznie, że kompleksy GyrA:GyrB się tworzą w sposób prawidłowy.

W części wynikowej pracy brakuje informacji o dokładnej liczbie powtórzeń wykorzystanych do obliczenia wyników zbiorczych (np. IC50), lub informacji o tym, że przedstawiane wyniki (np. rozdziały elektroforetyczne) są reprezentatywnymi wynikami z kilku (i z ilu) powtórzeń. Nawet jeśli w rozdziale Materiały i metody podano taką informację (np. w Rozdz. 3.3.4 podano, że ocena wartości MIC została wykonana w minimum trzech powtórzeniach biologicznych i dwóch technicznych), to pod rysunkami



i wykresami powinny być podane informacje o liczbie powtórzeń odnoszące się do konkretnej analizy i wyniku.

Wyniki są bardzo dobrze zaprezentowane i czytelne, z wyjątkiem opisu rysunków przedstawiających stabilność termiczną białek. Czcionka opisująca osie oraz legenda opisująca warianty białek są zbyt małe i warto na to zwrócić uwagę podczas przygotowywania wyników do publikacji.

Nie powinno się używać różnej liczby cyfr do podawania wyników analiz, jeśli nie wynikają one z różnic w dokładności pomiarów lub obliczeń. Np. w Tab. 4.4 lub 4.19 rozcieńczenia przygotowywano z taką samą dokładnością, a w Tab. 4.9 błąd pomiaru również prawdopodobnie był taki sam, a liczba cyfr znaczących w poszczególnych polach tabeli jest różna. Pomijanie cyfry „0” jeśli jest liczbą znaczącą, nie jest poprawne.

Uwagi ogólne do pracy:

Zamienne stosowanie jednostek stężeń masowo-objętościowych lub molowych sprawia trudności w porównywaniu danych i wyników, szczególnie w przypadku cząsteczek o różnych masach molowych lub wtedy, gdy nie znamy jej dokładnie (np. „Podobnie działają związki będące pochodnymi karbazoli, benzoindolu, czy indolu, zdolne do hamowania aktywności ATPazowej w 50% (IC₅₀) przy stężeniu <1 μM i z wartościami MIC względem szczepu *M. tuberculosis* H37Rv <25 μg/ml⁸⁰). Nie jest to problem tylko pracy Doktorantki, to dość często napotykana niekonsekwencja w podawaniu danych lub wyników w tego typu analizach.

W pracy znalazły się nieliczne błędy językowe, merytoryczne lub określenia żargonowe, na które zwracam uwagę z obowiązku recenzenta. Np. na stronie 31 podano informację, że „Pacjentom podaje się 400 mg moksyflokscyny raz na dobę⁷ oraz w zależności od masy ciała 750 –1500 mg lewoflokscyny raz na dobę⁵⁶”, podczas gdy terapie stosuje się zamiennie a nie równocześnie, dlatego zamiast oraz powinno być słowo lub; na stronie 27 grupę fosforanową DNA opisano jako grupę fosforylową; w Tab. 3.1 wskazane pochodzenie modelowego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv powinno się odnosić do oryginalnego źródła, kolekcji lub publikacji; na stronie 52 podano, że do transformacji *E. coli* użyto 100 μg DNA, a było to raczej 10-100 ng; w pracy stosowane jest określenie „kryształ” w rozumieniu struktury krystalicznej lub danych tej struktury, np. strona 39 Ryc. 1.19: (...) Kryształ 6ZT5 (A, B) oraz 2BM4 (C) pobrano z bazy PDB²⁷ (...)); strona 54: „Krzywe regresji dopasowano wykorzystując model regresji nieliniowej, logistycznej uwzględniającej fazy wzrostu bakterii.”

Powyższe uwagi i komentarze nie wpływają na moją **bardzo wysoką ocenę pracy doktorskiej i uzyskanych wyników**. Warte podkreślenia są 1/ ogrom pracy włożonej w przygotowanie materiałów do badań, w tym skonstruowanie licznych zmutowanych szczepów *M. tuberculosis* oraz wektorów ekspresyjnych, izolacja wielu wariantów białek, 2/ przeprowadzenie wielu analiz kompleksowo rozwiązujących problemy postawione w pracy, w tym analiz *in vivo*, co nie jest trywialne w przypadku wirulentnego, wolnorosnącego szczepu *M. tuberculosis* H37Rv; oraz 3/ uzyskanie wartościowych, wielowymiarowych wyników badań o znaczeniu poznawczym, diagnostycznym, ale także potencjalnie terapeutycznym w zakresie zastosowania zaproponowanej metodologii do poszukiwania związków antybiotycznych lub dalszych badań nad zidentyfikowanymi związkami. Warto dodać, że mgr Zygała-Pytlos jest współautorką pięciu opublikowanych prac naukowych związanych z tematyką pracy doktorskiej, oraz 10 zgłoszeń konferencyjnych, co wskazuje na to, że jest aktywnym młodym



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.hirszfeld.pl

naukowcem angażującym się w badania zespołu. Wyniki rozprawy doktorskiej nie są jeszcze opublikowane, ale stanowią już solidny materiał do opracowania manuskryptów.

Podsumowując recenzję rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Zygą-Pytlos stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk medycznych oraz wskazuje na to, że doktorantka potrafi samodzielnie prowadzić pracę naukową. Rozprawa doktorska mgr Darii Zygą-Pytlos spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Dlatego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN o dopuszczenie Pani mgr Darii Zygą-Pytlos do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych.

Mając na uwadze wysoką wartość uzyskanych wyników, ich szeroki zakres strukturalno-funkcjonalny, kompletność oraz znaczenie nie tylko poznawcze, ale potencjalnie aplikacyjne w diagnostyce i opracowaniu nowych związków terapeutycznych, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Anna Pawlik

Kierownik Laboratorium
Biologii Molekularnej Mikroorganizmów