

Dr hab. Aneta Agnieszka Bartosik
Pracownia Mikrobiologii Molekularnej i Genetyki Bakterii
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
e-mail: aneta2@ibb.waw.pl
tel.: (+48 22) 592 1212

Warszawa 03.07.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Darii Zygaly-Pytlos pt.
„Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych do optymalizacji inhibitorów
gyrazy *Mycobacterium tuberculosis*”

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Darii Zygaly-Pytlos stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Praca została wykonana w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk pod opieką naukową dr hab. Anny Brzostek, prof. IBM PAN. Badania opisane w rozprawie doktorskiej finansowane były z grantu SONATA BIS 9 2019/34/E/NZ6/00221 zatytułowanego „Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych w optymalizacji chemioterapii gruźlicy” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem była dr Alina Minias.

Podjęta w pracy tematyka stanowi ważny z medycznego, diagnostycznego czy epidemiologicznego punktu widzenia nurt badań naukowych dotyczący charakterystyki *Mycobacterium tuberculosis* w zakresie optymalizacji terapii gruźlicy poprzez usprawnienie diagnostyki i identyfikację nowych inhibitorów gyrazy DNA, będącej celem działania antybiotyków, m.in. z grupy fluorochinolonów, wykorzystywanych w leczeniu gruźlicy.

Gyraża DNA to enzym składający się z dwóch podjednostek GyrA i dwóch podjednostek GyrB tworzących heterotetramer, odpowiedzialny za regulację topologii DNA poprzez wprowadzanie ujemnych superskrętów w DNA. Gyraża DNA *M. tuberculosis* jest jedyną topoizomerazą typu II występującą u tej bakterii i jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórki. Z tego względu jest dogodnym celem działania antybiotyków, m. in. z grupy fluorochinolonów, do których należą: ciprofloksacyna, lewofloksacyna, moksyfloksacyna, ofloksacyna, czy gatifloksacyna.

Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Darii Zygala-Pytlos była ocena możliwości wykorzystania wzorcowania ewolucyjnego poprzez analizy zmienności sekwencji genów *gyrA* i *gyrB* służące poszukiwaniu skutecznych inhibitorów gyrazy DNA oraz identyfikacji mutacji związanych z występowaniem oporności. Doktorantka skupiła się na identyfikacji pozycji aminokwasowych warunkujących oporność *M. tuberculosis* na fluorochinolony oraz pozycji konserwatywnych, stanowiących potencjalne miejsca oddziaływania nowych inhibitorów gyrazy DNA, których poszukiwanie było zwieńczeniem pracy.

Rozprawa doktorska mgr Darii Zygala-Pytlos ma formę monografii liczącej 213 stron, napisanej w języku polskim, z podziałem na rozdziały charakterystyczne dla opracowań naukowych opartych o badania eksperymentalne: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Bibliografia oraz Suplement. Tytuł rozprawy doktorskiej oddaje poruszaną tematykę i odzwierciedla cele i zakres badań. Praca napisana jest klarownie, syntetycznie, stanowiąc bardzo ciekawą i wartościową lekturę.

Wstęp stanowi dobrze przemyślane wprowadzenie do tematyki podjętej w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej. Doktorantka w zwięzły sposób opisała zagadnienia związane z epidemiologią i chemioterapią gruźlicy, charakterystyką topoizomeras, ze szczególnym uwzględnieniem gyrazy DNA, jako celu działania leków oraz mutacji identyfikowanych w genach kodujących podjednostki gyrazy prowadzących do oporności. Opis metody wzorcowania ewolucyjnego z uwzględnieniem doboru oczyszczającego i różnicującego został także uwzględniony we wstępie, z podkreśleniem faktu, iż metoda ta nie została jak dotąd eksperymentalnie zweryfikowana, a szczepy *M. tuberculosis* mogą stanowić dogodny model badawczy ze względu na niską zmienność genetyczną.

W rozdziale Materiały i metody Doktorantka zawarła wszystkie niezbędne informacje na temat narzędzi bioinformatycznych, konstruktów, szczepów, buforów, podłoży, starterów, odczynników, enzymów, aparatury, wykorzystywanych w pracy, niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów i analiz. Co ważne, wykorzystywane do realizacji zadań badawczych metody zostały szczegółowo opisane, umożliwiając odtworzenie warunków eksperymentów. Osobny rozdział poświęcony został konstrukcji wektorów i szczepów wykorzystywanych w pracy wraz z załączonymi poglądowymi schematami. Warto podkreślić, że stosowane metody i techniki badawcze zostały dobrze przemyślane, logicznie i umiejętnie zastosowane i świadczą o bardzo dobrym, nowoczesnym warsztacie metodycznym Doktorantki.

Wyniki rozprawy doktorskiej opisane zostały w 5 rozdziałach, z których każdy podzielony został na mniejsze podrozdziały systematyzujące poruszane kwestie. Wyłaniają się główne nurty podjęte w pracy badawczej związane z: identyfikacją kodonów gyrazy DNA pod wpływem działania doboru naturalnego (wzorcowanie ewolucyjne), konstrukcją modeli genetycznych *M.*

tuberculosis pozbawionych natywnych genów *gyrA* lub *gyrB*; oceną wpływu mutacji w kodonach gyrazy na lekooporność *M. tuberculosis* (kodony pod doborem różnicującym); oceną wpływu mutacji punktowych w kodonach gyrazy na funkcjonowanie komórek *M. tuberculosis* oraz aktywność białek GyrA i GyrB (kodony pod doborem oczyszczającym); identyfikacją nowych, potencjalnych inhibitorów gyrazy. Mimo ogromnej ilości materiału do przedstawienia i przedyskutowania, lektura rozprawy doktorskiej Pani mgr Darii Zygala-Pytlos była przyjemnością ze względu na klarowne i syntetyczne opracowanie wyników, dobry wybór rycin, zdjęć i wykresów obrazujących najważniejsze rezultaty badań znacząco ułatwiających ich analizę i percepcję. Rozprawa doktorska zawiera także obszerny suplement stanowiący ważne uzupełnienie rozdziału wyników.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały także odpowiednio przedyskutowane w oparciu o aktualny stan wiedzy, w odniesieniu do najnowszych osiągnięć i badań w poruszanej tematyce w rozdziale Dyskusja. Zadbano o odpowiedni dobór cytowanej literatury. Co ważne podnoszone w dyskusji kwestie sugerują także dalsze kierunki badań, jakie mogą być podjęte w celu np. opracowania nowych inhibitorów gyrazy DNA. W osobnym rozdziale „Wnioski” wypunktowano najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu doktorskiego.

W recenzowanej pracy Doktorantka umiejętnie wykorzystała analizy bioinformatyczne, w tym wzorcowanie ewolucyjne, dokowanie molekularne, wytrenowany model sztucznej inteligencji, które umożliwiły identyfikację pozycji konserwatywnych w gyrazie DNA oraz mutacji prowadzących do uzyskania oporności. Co znaczące, analizy *in silico* powiązane zostały z solidną weryfikacją eksperymentalną zidentyfikowanych substytucji aminokwasowych w podjednostkach gyrazy z wykorzystaniem skonstruowanych modeli genetycznych, testów aktywności *in vitro*, pod kątem wpływu na funkcje gyrazy DNA oraz lekooporność.

Dzięki zastosowanym analizom zidentyfikowano pięć kodonów gyrazy DNA będących pod działaniem doboru różnicującego, w których mutacje mogą być związane z lekoopornością oraz 32 kodony będące pod działaniem doboru oczyszczającego, stanowiące potencjalne miejsca konserwatywne, które mogą posłużyć jako miejsca wiązania dla leków przeciwgruźliczych. Modele gyrazy DNA z podstawieniami wytypowanych mutacji posłużyły do identyfikacji potencjalnych inhibitorów gyrazy, które mogą mieć zastosowanie w terapii przeciwgruźliczej.

W pracy zastosowano oryginalny model genetyczny oparty na wprowadzeniu genu kodującego podjednostkę gyrazy w określone miejsce w genomie *M. tuberculosis* (*attB*) dzięki rekombinacji miejscowo-specyficznej, co umożliwiło sprawne, wydajne wprowadzanie genu z mutacją, przy jednoczesnej delecji genu w miejscu natywnym. Umożliwiło to przyspieszenie uzyskiwania mutantów do testów *in vivo*. Wprowadzenie genów z wytypowanymi mutacjami w pozycjach konserwatywnych umożliwiło ocenę istotności danej pozycji dla działania gyrazy i

wrażliwości na badane związki. Dla siedmiu kodonów z 32 wytypowanych nie udało się uzyskać szczepu z mutacją i te miejsca zostały przebadane pod kątem znaczenia dla funkcjonowania gyrazy oraz wiązania nowych inhibitorów.

Do najważniejszych wyników uzyskanych w pracy należy identyfikacja pozycji aminokwasowych w genach *gyrA* i *gyrB* kodujących podjednostki gyrazy DNA *M. tuberculosis* dzięki wykorzystaniu wzorcowania ewolucyjnego i eksperymentalna weryfikacja znaczenia wybranych mutacji punktowych w gyrazie DNA na funkcjonowanie bakterii (konstrukcja mutantów i ich analizy fenotypowe) oraz weryfikacja wpływu mutacji związanych ze wzrostem oporności na aktywność gyrazy oraz ocenę znaczenia wybranych miejsc konserwatywnych w testach *in vitro* (oczyszczanie białek, testy aktywności). Ponadto Doktorantka zidentyfikowała inhibitory gyrazy DNA *M. tuberculosis*, a dla wybranych związków przeprowadziła ocenę wpływu na aktywność gyrazy DNA w testach *in vitro* oraz *in vivo*.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sklasyfikowanie mutacji w kodonach 90, 94 w *gyrA* oraz 446, 447 w *gyrB* występujących w genomach *M. tuberculosis*, jako predysponujących szczepy do oporności na fluorochinolony. Dodatkowo zidentyfikowano mutacje w kodonach 446, 447, 565 *gyrB*, które warunkują oporność na gepotidacynę, co jest istotne dla potencjalnego wdrożenia inhibitorów z grupy nowych inhibitorów bakteryjnej topoizomerazy (NBTI) do schematów leczenia gruźlicy. W pracy określono mechanizm oporności mutantów w kodonach 446 oraz 447 *gyrB*, który opiera się na zahamowaniu zdolności gyrazy do wprowadzania cięć bez ponownego łączenia w obecności jonów wapnia oraz do dekatencji DNA. Zidentyfikowane w pracy konserwatywne kodony 41, 48, 114, 122, 347, 353 w *gyrB* oraz 131 w *gyrA*, stanowiąc mogą potencjalnie miejsce wiązania dla nowych inhibitorów będących podstawą leków przeciwgruźliczych. Z przebadanych w pracy inhibitorów wytypowanych na podstawie badań *in silico*, związki 1-2B, 1-10C, 1-12B zidentyfikowane jako inhibitory gyrazy DNA zawierającej mutacje w kodonie 90 i 94 *gyrA*, wykazują działanie przeciwpłatkowe w niskich stężeniach w stosunku do szczepu dzikiego, jak i mutantów *M. tuberculosis* opornych na fluorochinolony. Tym samym powinny zostać rozważone jako potencjalne leki i poddane dalszym badaniom przedklinicznym. Ponadto w pracy wytypowano związki 1-A07 oraz 1-G01 wiążące się do kodonów konserwatywnych 347 i 353 *gyrB*, które wykazują istotne działanie przeciwpłatkowe oraz zdolność do hamowania aktywności gyrazy DNA. Potencjalnie mogą one zapobiegać gromadzeniu mutacji warunkujących oporność szczepów *M. tuberculosis* i z tego względu powinny zostać poddane także dalszym badaniom. Uzyskane przez Panią mgr Darię Zygała-Pytlos oryginalne wyniki oceniam bardzo wysoko, a ich niezaprzeczalnym walorem jest możliwość bezpośredniego przełożenia uzyskanej wiedzy w diagnostyce i terapii przeciwgruźliczej.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych nielicznych nieścisłości, braków, niedociągnięć:

- brak informacji o ilości powtórzeń w wykonywanych eksperymentach, np. Ryc. 4.26, Ryc. 4.35, czy Ryc. 4.36;
- s. 147, Ryc. 4.40 – niepełny opis co dokładnie przedstawia rysunek, np. jakie białko, jaki związek;
- s.136 - błędne odwołanie do Ryc. 4.12, powinno być Ryc. 4.30;
- s.156 - błędne odwołanie do Ryc. 4.45, powinno być Ryc. 4.46;
- gdzieśgdzie, nielicznie w pracy występują literówki, błędy gramatyczne i wynikające z nich błędy stylistyczne.

Należy jednak podkreślić, że wypunktowane niedociągnięcia, braki nie umniejszają bardzo wysokiej, zdecydowanej pozytywnej ocenie rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników przez Panią mgr Darię Zygała-Pytlos.

Mam kilka pytań, kwestii, które nasunęły się po lekturze tej rozprawy, które zamieszczam poniżej, prosząc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony:

1. Z czego wynika niska zmienność genetyczna szczepów *M. tuberculosis*?
2. Jaki jest stopień podobieństwa, identyczności sekwencji aminokwasowej gyrazy DNA u przedstawicieli rodzaju *Mycobacterium*, typu *Actinobacteria* czy bakterii generalnie? Czy wyniki wzorcowania ewolucyjnego uzyskane dla *M. tuberculosis* z wykorzystaniem gyrazy DNA mogą być użyteczne dla innych patogennych bakterii?
3. Czy związki zidentyfikowane jako potencjalne inhibitory gyrazy DNA zostały scharakteryzowane pod kątem bezpieczeństwa wykorzystania w terapiach u człowieka?

Podsumowując, warto podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki medycznej stanowiąc oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną wyników prezentowanych w pracy. Kluczowe dla osiągnięcia postawionego na wstępie celu było zastosowanie przez Doktorantkę różnych analiz bioinformatycznych i podejść eksperymentalnych. Uzyskane wyniki ujawniają zaangażowanie, samodzielność i dużą wiedzę Doktorantki, tak w zakresie poruszanych zagadnień naukowych, jak i stosowanych metod, co potwierdza umiejętności i gotowość Pani mgr Darii Zygały-Pytlos do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienia badawcze i uzyskane oryginalne wyniki charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi, naukowymi, a co ważne z medycznego punktu widzenia mogą być bezpośrednio wykorzystane w diagnostyce i terapii zakażeń *M. tuberculosis*.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Darii Zygała-Pytlos spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej ustawie (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce). Z pełnym przekonaniem i poparciem zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Darii Zygała-Pytlos do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy prezentowanej rozprawy, zastosowane różnorodne, nowoczesne metody oraz poznawcze i co ważne z medycznego punktu widzenia praktyczne znaczenie uzyskanych wyników, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.

Dr hab. Aneta Bartosik