



Kraków, 7 lipca 2026

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Darii Zygala-Pytlos

Rozprawa doktorska mgr **Darii Zygala-Pytlos** pt. „Wykorzystanie wzorców ewolucyjnych do optymalizacji inhibitorów gyrazy *Mycobacterium tuberculosis*” została wykonana w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod opieką **dr hab. Anny Brzostek**, prof. IBM PAN.

1) Tematyka rozprawy

Nie ulega wątpliwości, że tematyka rozprawy doktorskiej pani Darii Zygala-Pytlos ma istotny wpływ na rozwój dyscypliny nauk medycznych, ponieważ dotyczy jednego z najważniejszych współczesnych problemów zdrowia publicznego. Ocenę tę uzasadniają zarówno aktualność problematyki badawczej, jak i nowatorstwo przyjętej koncepcji badawczej oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników.

Problem narastającej lekooporności prątka gruźlicy został trafnie przedstawiony jako jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Autorka wskazuje na rosnącą liczbę lekoopornych szczepów *M. tuberculosis* ograniczających skuteczność obecnie stosowanych fluorochinolonów, co uzasadnia potrzebę poszukiwania nowych terapeutycznych inhibitorów gyrazy DNA. Z tego względu sama problematyka pracy posiada wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną. Najważniejszym elementem nowości naukowej nie jest samo badanie gyrazy DNA, lecz zastosowanie wzorcowania ewolucyjnego (ang. *evolutionary patterning*) jako narzędzia do projektowania nowych inhibitorów przeciwgruźliczych. W swojej pracy autorka nie ograniczyła się do klasycznej analizy mutacji odpowiedzialnych za lekooporność, lecz wykorzystała zależności wynikające z działania doboru naturalnego do: (i) identyfikacji konserwatywnych miejsc białka, (ii) przewidywania miejsc związanych z rozwojem oporności, (iii) wskazania potencjalnych kieszeni wiązania nowych inhibitorów oraz (iv) eksperymentalnej weryfikacji uzyskanych przewidywań. Takie połączenie biologii ewolucyjnej, bioinformatyki, biologii strukturalnej i mikrobiologii stanowi nowoczesny kierunek badań i ma potencjał translacyjny.

2) Wiedza kandydatki

O przygotowaniu teoretycznym i wiedzy kandydatki świadczy rozbudowany wstęp, zawierający kompleksowy przegląd literatury dotyczącej epidemiologii gruźlicy, mechanizmów działania leków przeciwprątkowych, molekularnych podstaw lekooporności, biologii topoizomeraz bakteryjnych, budowy i funkcji gyrazy DNA oraz współczesnych strategii poszukiwania nowych inhibitorów tego enzymu. Szczególną uwagę zwraca logiczny układ zagadnień – od problematyki klinicznej, poprzez podstawy biologii molekularnej i biochemii enzymów, aż po uzasadnienie przyjętej koncepcji badawczej opartej na wzorcowaniu ewolucyjnym.

Istotnym atutem rozprawy jest umiejętne połączenie wiedzy z kilku obszarów nauki. Doktorantka integruje zagadnienia z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, biologii ewolucyjnej, bioinformatyki, biologii strukturalnej oraz chemii medycznej. Świadczy to o interdyscyplinarnym przygotowaniu teoretycznym oraz zdolności do krytycznej analizy bieżącego stanu wiedzy. Wysoki poziom przygotowania teoretycznego odzwierciedla się również w doborze metod badawczych. Autorka wykazuje znajomość podstaw analiz filogenetycznych i ewolucyjnych, narzędzi bioinformatycznych służących do identyfikacji miejsc podlegających różnym typom doboru naturalnego, metod przewidywania wpływu mutacji na funkcję białek oraz współczesnych metod komputerowego projektowania leków, w tym dokowania molekularnego i wykorzystania modeli sztucznej inteligencji do identyfikacji potencjalnych inhibitorów.

Reasumując, oceniam, że doktorantka wykazuje bardzo wysoką wiedzę teoretyczną w zakresie tematyki rozprawy i swobodnie porusza się w zagadnieniach mikrobiologii, biologii molekularnej, bioinformatyki i biologii ewolucyjnej. Potrafiła wykorzystać tę wiedzę do formułowania oryginalnych problemów badawczych i ich uzasadnienia. Zakres oraz poziom przedstawionej wiedzy w pełni odpowiadają wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim i stanowią jedną z mocnych stron ocenianej pracy.

3. Samodzielność kandydata

Na podstawie analizy rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że praca jednoznacznie potwierdza umiejętność doktorantki samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Świadczy o tym zarówno sposób sformułowania problemu badawczego, kompleksowość zastosowanej metodyki, jak i krytyczna analiza uzyskanych wyników oraz umiejętność formułowania wniosków i wskazywania dalszych kierunków badań.

Przede wszystkim doktorantka wykazała się umiejętnością identyfikacji istotnego i aktualnego problemu naukowego. Punktem wyjścia badań było rozpoznanie luki w istniejącym stanie wiedzy dotyczącej wykorzystania wzorcowania ewolucyjnego w projektowaniu inhibitorów gyrazy DNA *M. tuberculosis*. Cel pracy został jasno określony, a postawione hipotezy badawcze logicznie wynikają z przeprowadzonego przeglądu literatury.

O samodzielności badawczej świadczy również właściwy dobór oraz integracja różnorodnych metod badawczych. W ramach realizacji rozprawy doktorantka połączyła analizy bioinformatyczne i filogenetyczne z metodami biologii molekularnej, mikrobiologii, biochemii oraz modelowania molekularnego. Przeprowadziła identyfikację miejsc podlegających różnym typom presji selekcyjnej, zaprojektowała i skonstruowała odpowiednie mutanty białek, uzyskała rekombinowane białka, wykonała badania aktywności enzymatycznej, analizy wrażliwości na fluorochinolony oraz zweryfikowała przewidywania bioinformatyczne w doświadczeniach laboratoryjnych. Tak szeroki zakres metod świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodologicznym oraz umiejętności planowania wieloetapowych badań.

Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętność krytycznej interpretacji uzyskanych wyników. Doktorantka nie ogranicza się do przedstawienia rezultatów eksperymentów, lecz odnosi je do danych z literatury, wskazuje zgodności i rozbieżności z wcześniejszymi doniesieniami oraz omawia biologiczne znaczenie obserwowanych zależności. W dyskusji wykazuje zdolność do krytycznej oceny zarówno mocnych stron zastosowanego podejścia, jak i jego ograniczeń, co jest jedną z podstawowych cech dojrzałości naukowej.

Istotnym argumentem przemawiającym za samodzielnością badawczą jest także interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań. Realizacja projektu wymagała połączenia wiedzy z zakresu mikrobiologii, biologii molekularnej, biologii ewolucyjnej, bioinformatyki, biologii strukturalnej oraz chemii medycznej. Umiejętne wykorzystanie narzędzi z różnych dziedzin świadczy o zdolności do samodzielnego rozwiązywania złożonych problemów badawczych.

Na dojrzałość naukową doktorantki wskazuje również sposób formułowania wniosków. Wnioski wynikają bezpośrednio z uzyskanych rezultatów, odpowiadają na postawione cele badawcze oraz wskazują możliwości dalszego rozwoju przedstawionej koncepcji, w tym potencjalne zastosowanie wzorcowania ewolucyjnego w projektowaniu inhibitorów innych celów molekularnych.

Podsumowując, rozprawa dostarcza przekonujących dowodów, że doktorantka posiada kompetencje niezbędne do samodzielnego prowadzenia działalności naukowej. Wykazała umiejętność samodzielnego sformułowania problemu badawczego, opracowania odpowiedniej strategii eksperymentalnej, zastosowania nowoczesnych metod badawczych, krytycznej interpretacji wyników oraz wyciągania uzasadnionych wniosków. Przedstawiona praca świadczy o osiągnięciu dojrzałości badawczej wymaganej od osoby ubiegającej się o stopień doktora nauk biologicznych.

4. Oryginalność rozprawy

Podstawowym problemem naukowym poruszonym w rozprawie było ustalenie, czy analiza wzorców ewolucyjnych może stanowić skuteczne narzędzie identyfikacji aminokwasów gyrazy DNA odpowiedzialnych za rozwój lekooporności oraz czy te informacje mogą zostać wykorzystane do projektowania nowych inhibitorów tego enzymu.

Nowatorski charakter pracy przejawia się w integracji wielu komplementarnych metod badawczych. Doktorantka połączyła analizy filogenetyczne i bioinformatyczne z badaniami z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii, biochemii oraz modelowania molekularnego i komputerowego projektowania leków. Takie interdyscyplinarne podejście umożliwiło nie tylko weryfikację hipotez badawczych, ale także opracowanie spójnej strategii identyfikacji nowych potencjalnych inhibitorów gyrazy DNA.

Istotnym elementem oryginalności rozprawy jest także wykazanie, że analiza presji selekcyjnej pozwala przewidywać znaczenie funkcjonalne poszczególnych reszt aminokwasowych oraz wskazywać miejsca, które z dużym prawdopodobieństwem nie będą podatne na szybkie pojawianie się mutacji opornościowych. Wyniki te mają znaczenie nie tylko dla badań nad *M. tuberculosis*, lecz także mogą stanowić podstawę do opracowania analogicznych strategii projektowania leków skierowanych przeciwko innym bakteryjnym celom molekularnym.

Podsumowując, uważam, że rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ponieważ proponuje nowatorskie wykorzystanie wzorcowania ewolucyjnego w badaniach nad gyrazą DNA *M. tuberculosis*, dostarcza pierwszej eksperymentalnej walidacji tej koncepcji oraz wykazuje jej przydatność w identyfikacji nowych celów dla projektowania inhibitorów przeciwgruźliczych. Uzyskane wyniki poszerzają aktualny stan wiedzy, rozwijają metodykę badań nad bakteryjnymi topoizomerezami i otwierają nowe perspektywy dla racjonalnego projektowania leków. Tym samym rozprawa spełnia ustawowe kryterium oryginalnego rozwiązania problemu naukowego i wnosi wartościowy wkład w rozwój dyscypliny nauk biologicznych.

Uwagi krytyczne

Nie ulega najmniejszej wątpliwości, że w rozprawie doktorskiej pani Darii Zygala-Pytlos dobrze zaplanowała i konsekwentnie zrealizowała postawione cele badawcze. Nie oznacza to jednak, że jest pozbawiona elementów podlegających krytyce. Poniżej przedstawiam kwestie, które mogą stanowić przedmiot dyskusji, a które odnoszą się przede wszystkim do zakresu przeprowadzonych doświadczeń, interpretacji wyników oraz stopnia realizacji założonych celów badawczych. Są to raczej ograniczenia pracy niż jej zasadnicze wady.

1. Niepełna eksperymentalna walidacja wszystkich przewidywań bioinformatycznych

Największą zaletą pracy jest wykorzystanie wzorcowania ewolucyjnego do identyfikacji funkcjonalnie istotnych reszt aminokwasowych. Jednak jedynie część przewidywań została zweryfikowana eksperymentalnie. Można zatem postawić pytanie, czy wybrane mutacje są reprezentatywne dla całego modelu i czy podobne zależności występowałyby również dla pozostałych przewidywanych pozycji.

2. Ograniczona walidacja nowych inhibitorów

Jednym z celów pracy było wykorzystanie wzorców ewolucyjnych w projektowaniu nowych inhibitorów. W praktyce etap ten zakończył się identyfikacją kandydatów metodami obliczeniowymi oraz ich wstępną oceną biologiczną. Powoduje to, że część aplikacyjna pracy ma raczej charakter *proof of concept* niż pełną walidację strategii projektowania leków.

3. Ograniczona dyskusja dotycząca ograniczeń metody wzorcowania ewolucyjnego

Dyskusja jest obszerna i dobrze udokumentowana literaturowo, jednak dominuje interpretacja potwierdzająca postawione hipotezy. Stosunkowo niewiele miejsca poświęcono alternatywnym wyjaśnieniom uzyskanych wyników, przypadkom, w których wyniki nie były całkowicie zgodne z przewidywaniami modeli bioinformatycznych, oraz sytuacjom, w których analiza presji selekcyjnej może prowadzić do błędnych przewidywań.

Wskazane wyżej uwagi dotyczą przede wszystkim zakresu walidacji eksperymentalnej oraz głębokości interpretacji wyników i w żaden sposób nie umniejszają wartości tej rozprawy doktorskiej. Ta krytyka ma zachęcić do dyskusji podczas publicznej obrony, ponieważ umożliwi w pełni ocenę dojrzałości naukowej doktorantki, jej krytycznego stosunku do własnych wyników oraz zdolności do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Proponowane pytania podczas obrony

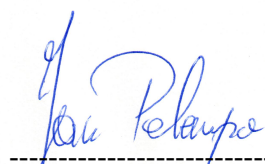
1. Dlaczego do walidacji eksperymentalnej wybrano właśnie te aminokwasy spośród wszystkich wskazanych przez analizę wzorcowania ewolucyjnego?
2. Jakie są najważniejsze ograniczenia wykorzystanej metody wzorcowania ewolucyjnego i w jakich sytuacjach może ona prowadzić do błędnych przewidywań?
3. Czy przedstawiona metoda może być stosowana również do innych topoizomeraz bakteryjnych? Jakie warunki muszą zostać spełnione?
4. Jakie kolejne doświadczenia należałoby przeprowadzić, aby potwierdzić, że wskazane związki rzeczywiście mogą stać się kandydatami na nowe leki przeciwgruźlicze?
5. Czy obserwowane zmiany aktywności mutantów wynikają wyłącznie ze zmiany właściwości miejsca aktywnego, czy również ze zmian stabilności lub fałdowania białka? Jak można byłoby to zweryfikować eksperymentalnie?
6. Na ile wyniki uzyskane dla różnych szczepów *M. tuberculosis* można przenieść na inne gatunki bakterii? Jakie ograniczenia wiążą się z taką ekstrapolacją?

7. W jaki sposób zastosowanie sztucznej inteligencji wpłynęło na wybór kandydatów na inhibitory i czy wyniki uzyskane metodami AI różniły się od klasycznego dokowania molekularnego?
8. Czy wśród zidentyfikowanych miejsc podlegających silnej konserwacji ewolucyjnej znajdują się takie, których mutacja byłaby prawdopodobnie letalna dla bakterii? Jak można byłoby to zweryfikować?
9. Czy na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wzorcowanie ewolucyjne będzie skuteczniejszym narzędziem projektowania inhibitorów niż klasyczne podejście oparte wyłącznie na analizie struktury białka? Jakie argumenty przemawiają za taką tezą?

Ogólna ocena

Recenzowana rozprawa doktorska pani Darii Zygala-Pytlos przekonująco zrealizowała ambitne, oryginalne cele badawcze w sposób spójny i metodologicznie poprawny. Jednoznacznie rozprawa wskazuje na rozległą wiedzę teoretyczną oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej, co sprawia, że doktorantka spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Upoważnia mnie to do złożenia wniosku do Rady Naukowej IBM PAN o dopuszczenie **Darii Zygala-Pytlos** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauk medycznych.

Na koniec, doceniając zakres przeprowadzonych badań, ich jakość i nowatorski charakter, zgłaszam wniosek o wyróżnienie rozprawy odpowiednią nagrodą.



Prof. dr hab. Jan Potempa, 2 x Dr h.c.
Kierownik Zakładu Mikrobiologii
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków