



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 24.08.2020 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Bożeny Czubat, studentki Stacjonarnego Studium Doktoranckiego Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego pt. „Synteza witaminy B₁₂ u mykobakterii”

Praca doktorska mgr Bożeny Czubat, wykonana w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Dziadka i dr Aliny Minias, ma postać obszernej monografii (148 stron), opracowanej bardzo starannie i zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Przed przystąpieniem do właściwej recenzji pracy doktorskiej sprawdziłem, czego można dowiedzieć się na temat Kandydatki w bazie PubMed. Znalazłem dwie publikacje, pod nazwiskiem Czubat z inicjałem B., które można przypisać Doktorantce i które mają tytuły odpowiadający zakresowi badań opisanych w pracy doktorskiej. Pierwsza z nich dotyczący oceny możliwości syntezy witaminy B₁₂ przez *Mycobacterium tuberculosis*. Praca ta została opublikowana w 2018 roku w czasopiśmie *Genome Biology and Evolution* (IF 3,726). Mgr Bożena Czubat jest również współautorem kolejnej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* (IF 4.235), w którym opublikowano wyniki eksperymentalne recenzowanej pracy doktorskiej. Jest to całkiem dobry start jak na początek kariery naukowej i po lekturze pracy doktorskiej jestem pewny, że sytuacja ta wkrótce ulegnie zmianie. Dane uzyskane za pośrednictwem bazy PubMed znaczą, że badania zostały już pozytywnie zweryfikowane przez co najmniej czterech zewnętrznych recenzentów. Nie zwalnia mnie to oczywiście z obowiązku pracy recenzenta.

Tematyka i cele recenzowanej pracy doktorskiej mieszczą się w głównym kierunku wieloletnich, bardzo owocnych badań podstawowych prof. dr hab. Jarosława Dziadka i Jego współpracowników z Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* PAN w Łodzi dotyczącym szeroko rozumianej biologii molekularnej mykobakterii, w tym szczególnie roli mechanizmów replikacji i naprawy DNA, transdukcji sygnału, metabolizmu cholesterolu oraz biosyntezy ściany komórkowej mykobakterii przede wszystkim w aspekcie mechanizmów wirulencji prątków gruźlicy. Pani mgr Bożena Czubat podjęła szeroko zakrojone badania poznawcze dotyczące roli witaminy B₁₂ u dwóch gatunków mykobakterii: *M. tuberculosis* i *Mycobacterium smegmatis*. W pracy brakuje uzasadnienia podjęcia tematu, tym niemniej na podstawie lektury Wstępu wydedukowałem, że niektóre geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm B₁₂ stanowią potencjalne miejsce docelowe w leczeniu chorób wywołanych infekcją mykobakteriami. Pomimo znacznego postępu w leczeniu gruźlicy i

mykobakterioz, nadal poważnym problemem są nawroty tych chorób wynikające z braku pozytywnej odpowiedzi na zastosowaną z wyboru strategię terapeutyczną i rosnącą lekooporność szczepów patogennych dla człowieka. Nie ulega wątpliwości, że ograniczona liczba miejsc docelowych w komórkach mykobakterii rozpoznawanych przez stosowane obecnie w terapii chorób wywoływanych przez mykobakterie leków wskazuje na konieczność poszukiwania alternatywnych. Stąd, podzielałam pogląd Doktorantki przedstawiony w recenzowanej pracy, że poznanie genów metabolizmu witaminy B₁₂ u mykobakterii może być ważnym kluczem dla poszukiwania i identyfikacji miejsc docelowych dla syntezy nowych leków, które byłyby skuteczne w terapii ludzi zakażonych mikrobakteriami. Należy w tym miejscu dodać, że od bardzo wielu lat nie wprowadzono do leczenia gruźlicy i mykobakterioz nowych leków i w związku z tym narasta zagrożenie związane z pojawianiem się i transmisją szczepów/klonów opornych na większość, a nawet wszystkie dotychczas stosowane leki w leczeniu tych chorób. **Myślę, że obrona pracy doktorskiej mgr Bożeny Czubat będzie dobrym forum na porównanie mojej i Jej wizji Uzasadnienia podjęcia tematu.**

Cztery jednoznacznie sformułowane cele pracy uznaję za ważne i w pełni uzasadnione w świetle danych literatury światowej przedstawionych w części teoretycznej (Wstęp). Postanowiono bowiem, po pierwsze, ustalić ocenę możliwości syntezy witaminy B₁₂ przez *M. tuberculosis*. Po drugie, podjęto próbę określenia znaczenia domeny CobC dla funkcjonowania jednego z białek metabolizmu witaminy B₁₂ w komórkach *M. smegmatis*. Po trzecie, przeprowadzono analizę fenotypową mutantu *M. smegmatis*, u którego zmodyfikowany jest szlak syntezy witaminy B₁₂ i po czwarte postanowiono zidentyfikować czynniki środowiskowe wpływające na syntezę witaminy B₁₂. Nie chcę wyróżniać spośród tych czterech celów pracy najważniejszego – w mojej opinii wszystkie są szczególnie interesujące, bowiem układają się razem w jedną całość i dotyczą próby odpowiedzi na bardzo ważne pytanie o znaczeniu praktycznym - czy białka metabolizmu witaminy B₁₂ mogą być miejscem/ami docelowymi nowych leków przeciwpłatkowych.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem bardzo dobrze skonstruowany i napisany Wstęp pracy doktorskiej mgr Bożeny Czubat. Wstęp ten można podzielić na dwie części – poświęcone kolejno dwóm szczepom badanym w pracy: *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* oraz witaminie B₁₂. W pierwszej części Autorka opisuje w kolejnych podrozdziałach epidemiologię gruźlicy, zmienność genetyczną *M. tuberculosis* i *M. smegmatis* jako modelowy szczep do badań genetyki i fizjologii prątków. W świetle wyników cytowanych w tych podrozdziałach wyników osiągniętych przez innych autorów wynika, że poznanie i zrozumienie mechanizmów metabolicznych mykobakterii, podlegających selekcji negatywnej, jest jednym z pierwszych warunków niezbędnych do identyfikacji nowych miejsc docelowych leków przeciwpłatkowych. Stąd, postanowiono przeprowadzić takie badania *in silico*, wykorzystując powszechnie dostępne informacje o sekwencji genomów kolekcji *M. tuberculosis* i przełożyć je w podejściu eksperymentalnym na modelowy organizm w badaniu prątków – *M. smegmatis*.

W drugiej części Wstępu mgr Bożena Czubat przedstawiła z dużym zapałem aktualną wiedzę na temat witaminy B₁₂ w kontekście jej biosyntezy i funkcji w szczepach *M. tuberculosis* i *M.*

smegmatis. W poszczególnych podrozdziałach Doktorantka opisała budowę i rolę witaminy B₁₂ a następnie scharakteryzowała prokariotyczne szlaki jej biosyntezy i wchłaniania z uwzględnieniem mykobakterii. Jak się okazuje witamina B₁₂ występuje jako kofaktor trzech enzymów mykobakterii i pełni funkcję regulatora ekspresji genów występując w kompleksie z ryboprzełącznikami. Wstęp kończy opis RNazy klasy I (białko Rv2228c) *M. tuberculosis* kodowanej przez genrv2228c. Z nieznanymi mi przyczyn Doktorantka zatytułowała ten podrozdział białko MSMEG4305, prawdopodobnie dlatego, że homologiem białka Rv2228c *M. tuberculosis* jest wspomniane przez Doktorantkę w jednym zdaniu białko MSMEG4305 *M. smegmatis*. Białko Rv2228c jest dwudomenowe – pierwsza domena odpowiada za właściwości RNazy, druga (CobC) zaś uczestniczy w syntezie witaminy B₁₂. Po przestudiowaniu tego podrozdziału lepiej zrozumiałem, że poszukiwanie w bardzo złożonym szlaku biosyntezy witaminy B₁₂ nowych celów terapeutycznych dla leków przeciwprątkowych jest w pełni uzasadnione. Łatwiej jest bowiem specyficznie zahamować domenę CobC niż domenę RNAzową – ta druga jest charakterystyczną dla większości prokariotów i taki lek nie będzie wykazywał pożądanej specyficzności substratowej ze względu na podobieństwa pomiędzy RNazami różnych gatunków *Prokaryota*. Stąd, projekt badań poznawczych, realizowany w pracy oceniam bardzo pozytywnie zarówno w perspektywie skali podjętych badań, jak też nowych wyzwań poznawczych odważnie podjętych przez Promotora i Doktorantkę, stanowiących kontynuację badań nad mykobakteriami prowadzonych od lat w Pracowni Genetyki i Fizjologii *Mycobacterium* Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

Materiał do badań stanowiła wirtualna baza szczepów *M. tuberculosis* oraz 22 nie wirtualnych szczepów *Escherichia coli* i *M. smegmatis* opisanych przez Doktorantkę w tabeli 3.1. Należy podkreślić, że wielkość z nich (19 z 22) została skonstruowana do celów recenzowanej pracy. Jako osoba mająca w swoim naukowym CV konstrukcję rozmaitych szczepów prokariotów doceniam ten znaczny wysiłek, który bardzo często stanowi zaledwie wstęp do dalszej analizy. Nie mam żadnych zastrzeżeń i pytań dotyczących zastosowanych metod technik badawczych, opisanych bardzo skrupulatnie na 33 stronach pracy, obejmujących różnorodne metody mikrobiologiczne, biologii molekularnej i bioinformatyki. Profesjonalne przedstawienie stosowanych metod jest najlepszym potwierdzeniem, że Autorka opanowała bardzo bogaty warsztat metodyczny.

Po przestudiowaniu interesującej części teoretycznej i ambitnych celów pracy mgr Bożeny Czubał, w szczególności zaś po zapoznaniu się z warsztatem badawczym i metodami praktycznej realizacji założonych celów - przystąpiłem do studiowania rezultatów całej pracy w oczekiwaniu na ciekawe, ważne wnioski końcowe. W pierwszej części rozdziału Wyniki Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki dotyczące analizy *in silico* zróżnicowania genetycznego genów kodujących białka zaangażowane w biosyntezie witaminy B₁₂. Badania te przeprowadziła z użyciem kilku narzędzi bioinformatycznych na wirtualnej kolekcji szczepów *M. tuberculosis* określając stosunek mutacji niesynonimicznych do synonimicznych (tzw. wartość dN/dS) i wpływ mutacji na funkcjonalność genu *rv2228c*. Oczywiście z powodu braku funkcjonalnej, biochemicznej analizy mutantów *rv2228c* wnioski płynące z tej części pracy należy traktować z pewną dozą ostrożności. Tym niemniej Doktorantka

wskazuje na możliwość istnienia aktywnego szlaku metabolizmu witaminy B₁₂ ze względu zaobserwowaną przez Nią na selekcję negatywną, charakterystyczną dla funkcjonalnych i istotnych dla organizmu obszarów genomu. Ponadto, Autorka wskazuje na bardzo silną selekcję negatywną w obszarze genu kodującego domenę CobC, tym samym potwierdzając słuszność swoich wcześniejszych założeń dotyczących potencjalnego wykorzystania tej domeny jako tarczy dla leków przeciwpłatkowych. Przechodząc do recenzji drugiej części Wyników muszę przyznać, że studiowanie tej świetnie opracowanej części rozdziału Wyniki było dla mnie jako recenzenta i biologa molekularnego zarówno przyjemnością, jak i również znacznie większym wyzwaniem intelektualnym. Doktorantka wraz z Promotorami przedstawiają w tej części rozdziału świetnie udokumentowane, bardzo wiarygodne wyniki wielokierunkowych badań mutantów *M. smegmatis* ze zmodyfikowanym szlakiem biochemicznym biosyntezy witaminy B₁₂. Z analizy udokumentowanych wyników wnoszę, że praca została wykonana bardzo dobrze, przy pomocy obowiązujących metod i technik, a analiza statystyczna ostatecznych rezultatów pozwoliła na sformułowanie uprawnionych wniosków. Doceniając ogrom pracy włożony w konstrukcję i analizę mutantów przez Doktorantkę i Promotorów uważam, że uzyskane wyniki, wnoszą nowe, szczegółowe dane i informacje do dyskusji o roli szlaku metabolizmu witaminy B₁₂ u mykobakterii. Nie dostrzegam potrzeby oceny wszystkich wyników i ich wartościowania, pragnę jedynie skomentować te rezultaty i wnioski, które dla mnie biologa są najważniejsze, oryginalne i okazały się godne wartościowej publikacji w „rankingowym” czasopiśmie naukowym. Do tych rezultatów opisanych w tej części rozdziału (Wyniki) zaliczam:

- Wykazanie w testach immunoenzymatycznych i z wykorzystaniem cytometru przepływowego, że produkt genu *msmeg4305* uczestniczy w biosyntezie witaminy B₁₂ u *M. smegmatis*.
- Ustalenie to, bardzo dobrze koreluje z wynikami pokazującymi, że domena CobC nie interferuje z aktywnością domeny RNazowej.
- Dobrze udokumentowane wyniki wskazują także, że niektóre czynniki środowiskowe takie jak głód komórkowy stymulują *M. smegmatis* do akumulacji witaminy B₁₂.

W świetle uzyskanych rezultatów można, moim zdaniem, sformułować ogólny wniosek, że geny związane z witaminą B₁₂ są istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórki mykobakterii.

W zakończeniu oceny dodam, że Dyskusja pracy jest dobrze skonstruowana i napisana ładnym językiem naukowym. Co ważne, w Dyskusji mgr Bożena Czubat nie tylko podsumowała najważniejsze własne rezultaty, ale sformułowała także bardziej ogólne, uprawnione wnioski i hipotezy w oparciu o własne wyniki oraz zgromadzoną wiedzę w literaturze przedmiotu. W części teoretycznej oraz w dyskusji cytuje ponad 161 literatury światowej, w duże części prac opublikowanych w latach 2010 - 2020. Pięć końcowych wniosków, sformułowanych na stronie 128 pracy, uznaję za zasadne i uprawnione. W bardzo dobrze opracowanym Streszczeniu znajduje się też podsumowujący wniosek ogólny, który powinien być zaprezentowany na początku rozdziału Wnioski.

Ponieważ z założenia recenzent tropi niedociągnięcia, błędy etc. dlatego poniższy fragment recenzji skupia się na tych właśnie sprawach.

- Poproszę o szersze przedstawianie danych dotyczących „powszechności” szczepień przeciwko gruźlicy w kontekście liczebności populacji mających problemy z występowaniem tej choroby.
- Doktorantka wykorzystywała najstarszą i najczęściej stosowaną metodę wnioskowania presji selekcyjnej w genach kodujących białka (stosunek dN/ds.). Alternatywnym podejściem jest model mutacji-selekcji (MutSel). Model MutSel umożliwia ocenę siły i kierunku selekcji działającej na określone mutacje. Model ten korzysta z genetyki populacyjnej populacji i pozwala oszacować skalowane współczynniki selekcyjne specyficzne dla danego miejsca mutacji. Można zatem ocenić stopień, w jakim selekcja naturalna sprzyja lub nie sprzyja zmianom w kodonie i/lub aminokwasach. W mojej ocenie interesujące byłoby potwierdzić wnioski uzyskane za pomocą modelu dN/dS stosując alternatywne i w mojej ocenie lepsze, bo dające więcej informacji podejście MutSel.
- Dlaczego nie przeprowadzono analizy dN/dS oddzielnie dla trzech największych linii rodowodowych *M. tuberculosis* (Rys. 4.3). Nie można wykluczyć, że te trzy linie rozwijają się niezależnie od siebie.
- Skąd wiadomo, że insercje i delecje zidentyfikowane w genie rc2228c wyłączają gen?
- Co oznacza szkodliwy i neutralny wpływ SNP (tabela 4.4)?
- Brakuje informacji o teście używanym do oceny jednorodności wariancji i normalności rozkładu. Do oceny jednorodności wariancji w pakiecie Statistica stosowany jest test Levene'a lub test Browna-Forsythe'a. Podobnie, co najmniej trzy testy mogą być wykorzystywane do oceny normalności rozkładu.
- Według założeń prezentacji wyników testu ANOVA powinno się podawać wartość statystyk F (obok wartości p) zarówno w przypadku wyników istotnych jak i nieistotnych statystycznie oraz wartość n. Dotyczy to przede wszystkim opisów pod rycinami.
- Ryciną (ryc.) (a nie Rysunkiem – rys.!) można nazwać w pracy drukowanej wszystko poza tekstem i tabelami, a więc rysunek, wykres, schemat ale także fotografię czy fragment zapisu (np. elektrokardiograficznego) przygotowany do publikacji. Również podstawową zasadą obowiązującą dla tabel i rycin jest ich niezależność od tekstu, czyli możliwość zrozumienia istoty tabeli czy ryciny bez konieczności wczytywania się w tekst pracy.
- Czy sprawdzono potencjalne zmiany ekspresji genu referencyjnego *sigA* w warunkach głodu komórkowego? Jeśli nie to wyniki te trzeba uzupełnić o tę analizę – możliwe obniżenie/podwyższenie poziomu ekspresji tego genu w odpowiedzi na stres głodowy może zaburzyć całe wnioskowanie w podrozdziale 4.4.

Podsumowując stwierdzam, że bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę mgr Bożeny Czubat. Charakterystyka i bardzo wnikliwa analiza mutantów *M. smegmatis* dostarczyły oryginalnych wyników o niepodważalnej wartości poznawczej. Do sukcesu Doktorantki i Promotorów przyczyniło się zarówno bardzo szerokie spektrum zastosowanych technik badawczych, jak i wieloaspektowa analiza mutantów *M. smegmatis*. Opiniowana praca w pełni spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o

stopień naukowy doktora. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr Bożeny Czubat do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Logicznie zaplanowana, systematyczna analiza otrzymanych mutantów, nowoczesność warsztatu badawczego i wartość poznawcza uzyskanych wyników poparta ich publikacją w czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania uzasadniają w mojej opinii wniosek o uznanie pracy doktorskiej mgr Bożeny Czubat za wyróżniającą.

Opin P. Piś.