INSTYTUT BiolMed

Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630

e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

Łódź, 3 lutego 2022

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej **mgr Katarzyny Krysztopa-Grzybowskiej pt. „Genetyczna charakterystyka *Mycobacterium bovis* BCG podszczepu Moreau stosowanego do powszechnych szczepień przeciw gruźlicy w Polsce".**

Recenzowana praca została wykonana w Zakładzie Badania Surowic i Szczepionek Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH pod opieką prof. dr hab. Ewy Augustynowicz-Kopeć, jako promotora, oraz dr Dominika Strapagiela jako promotora pomocniczego. Ze względu na miejsce pracy, oraz konieczność pozyskania wiedzy o wykorzystywanym w Polsce szczepie szczepionkowym, przed Doktorantką postawiono niezwykle ważne zadanie przeprowadzenia charakterystyki genetycznej, polskiego wariantu szczepu *M. bovis* BCG Moreau z wykorzystaniem nowoczesnych technik sekwencjonowania i analizy DNA. Z punktu widzenia zdrowia publicznego oraz badań stabilności szczepu, powszechnie stosowanego do szczepień noworodków tematykę pracy Doktorantki uważam za niezwykle aktualną i ważną. Realizacja głównego celu pracy wymagała od Doktorantki zastosowania szeregu zaawansowanych metod bioinformatycznych do analiz genomów szczepów sekwencjonowanych w ramach realizowanego projektu jak i genomów wzorcowych zdeponowanych w bazie NCBI.

Układ tekstu jest typowy dla prac eksperymentalnych. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym napisanym bardzo ładnym językiem naukowym, przedstawiającym aktualne dane dotyczące epidemiologii gruźlicy, mechanizmów zakażenia prątkiem gruźlicy, taksonomii *M. tuberculosis* oraz jego czynników wirulencji. Następnie ze względu na temat badań własnych Doktorantka przedstawia historię szczepień BCG oraz aktualną wiedzę dotyczącą podszczepów szczepionkowych używanych na świecie. Tę bardzo ciekawą część pracy Doktorantka kończy prezentacją nowych szczepionek przeciw gruźlicy wraz z informacją o stanie zaawansowania badań klinicznych w tym zakresie.

INSTYTUT BiolMed
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

W części eksperymentalnej pracy Doktorantka podjęła się weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że w wykorzystywanym w Polsce do szczepień przeciw gruźliczych szczepie *M. bovis* BCG Moreau doszło do zmian genetycznych i różni się on pod względem genetycznym od innych podszczepów BCG.

W rozdziale Materiały i Metody autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury zarówno eksperymentalne jak i bioinformatyczne są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie trzech komplementarnych technik sekwencjonowania DNA, NGS NextSeq 500 Illumina, NGS MinION oraz techniki Sangera dla pozyskania *de novo* pełnej sekwencji genomowej badanych szczepów szczepionkowych. Za właściwy należy także uznać dobór szczepów poddanych sekwencjonowaniu oraz genomy referencyjne z którymi porównywano uzyskane sekwencje.

Część eksperymentalna badań miała na celu ocenę stabilności genetycznej polskiego wariantu szczepu *M. bovis* BCG Moreau, uzyskanie pełnej sekwencji genomu tego szczepu oraz zidentyfikowanie różnic między polskim szczepem szczepionkowym a wariantem BCG Moreau RDJ oraz BCG Pasteur. Po analizie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że wszystkie postawione przed Doktorantką cele zostały w pełni zrealizowane a zastosowana metodologia badań została dobrana prawidłowo i pozwoliła uzyskać w pełni wiarygodne wyniki. Do badań stabilności genetycznej włączono pięć serii szczepu szczepionkowego pochodzących z 1957, 2000 i 2015 roku. Dane sekwencyjne uzyskane z wykorzystaniem platformy Illumina zmapowano do genomu referencyjnego (Moreau RDJ), a po utworzeniu sekwencji konsensusowych (BSFtools) określono średnie podobieństwo (fastANI) na poziomie >99,98%. Następnie zastosowano program breseq dla identyfikacji mutacji typu substytucji oraz delecji lub insercji. Znakomita większość mutacji typu SNP (122/136) oraz INDEL (22/24) identyfikowana w stosunku do genomu referencyjnego znajdowała się we wszystkich badanych genomach. Weryfikacja unikalnych zmian w programie IGV wykazała ich obecność we wszystkich pięciu seriach polskiego szczepu szczepionkowego wskazując na całkowitą stabilność genetyczną szczepu *M. bovis* BCG Moreau PL na przestrzeni lat w Polsce.

Ze względu na identyczność pozyskanych sekwencji połączono odczyty uzyskane na platformie Illumina dla wszystkich pięciu serii celem złożenia *de novo* genomu BCG-Moreau PL. Bardzo słusznym posunięciem Doktorantki było dodatkowe przeprowadzenie

93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

sekwencjonowania jednej z roboczych serii na platformie MinION. Takie podejście metodyczne pozwoliło Doktorantce uzyskać średnie pokrycie badanej sekwencji na poziomie 240 odczytów na platformie Illumina oraz 40 na platformie MinION oraz uporządkować kontigi (CONTIGuator) i uzyskanie roboczą postać genomu. **W tym miejscu chciałbym zapytać Doktorantkę czy sekwencjonowanie nanoporowe, oprócz niewątpliwej pomocy w złożeniu kontigów w jedną cząsteczkę, pozwoliło także zidentyfikować sekwencje powtórzone (np. MIRU/VNTR), które nie były identyfikowane w analizach na platformie Illumina?** Sekwencja robocza polskiego szczepu szczepionkowego została następnie poddana analizie porównawczej z sekwencją wzorcową szczepu BCG-Moreau RDJ (breseq, IGV) w celu identyfikacji mutacji typu substytucji oraz insercji i delecji. Obecność mutacji niesynonimicznych oraz znajdujących się w potencjalnych obszarach promotorowych została następnie weryfikowana z zastosowaniem sekwencjonowania Sangera. Znakomita większość mutacji zidentyfikowanych metodami NGS została potwierdzona w sekwencjonowaniu Sangera. Zastanawia mnie tylko identyfikacja dodatkowych 5 mutacji SNP i 4 mutacji INDEL w technice Sangera, których nie zidentyfikowano sekwencjonowaniem NGS. Rozumie, że różnice te dotyczą jednak wyłącznie analizy breseq a mutacje te były identyfikowane w analizie IGV. **Czy mogłaby Doktorantka wyjaśnić poziom zgodności pomiędzy NGS (po przeprowadzeniu analiz breseq oraz IGV) i sekwencjonowaniem techniką Sangera oraz ewentualnie wskazać przyczyny rozbieżności, szczególnie dotyczącą insercji 1340 pz, której nie potwierdzono metodą Sangera?** Chciałbym podkreślić, że weryfikacja wszystkich „istotnych" mutacji identyfikowanych w NGS metodą Sangera była bardzo cennym podejściem metodycznym pozwalającym na uzyskanie bardzo wysokiej jakości genomu polskiego szczepu szczepionkowego. Zastanawiają mnie jedynie kryteria klasyfikacji mutacji jako „istotnych". **Nie mam wątpliwości, że wybór mutacji niesynonimicznych był właściwym podejściem, natomiast ograniczenie się do analizy mutacji w obszarach promotorowych genów w regionach niekodujących może wpłynąć na pominięcie istotnych zmian wpływających chociażby na małe cząsteczki RNA pełniące funkcje regulatorowe. Poproszę Doktorantkę o komentarz na ten temat.** Przeprowadzone analizy pozwoliły Doktorantce na określenie różnic na poziomie 175 mutacji pomiędzy polskim oraz wzorcowym szczepem BCG-Moreau. Wszystkie mutacje niesynonimiczne zmapowano do odpowiednich ramek odczytu a ponad połowa z nich dotyczyła wysoce zmiennych genów kodujących białka z rodziny PE. Wśród

INSTYTUT BiolMed
Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
93-232 Łódź
ul. Lodowa 106
tel.: 042 2723610
fax.:042 2723630
e-mail: jdziadek@cbm.pan.pl
www.cbm.pan.pl

mutacji typu INDEL najbardziej interesującą wydaje się delecja prawie 10 000 pz obejmująca m.in. geny dla systemu toksyna/antytoksyna MazF6. **Prosiłbym Doktorantkę o krótkie scharakteryzowanie systemów toksyna-antytoksyna u prątków gruźlicy w aspekcie wirulencji**. W Tabeli 10 Doktorantka przedstawiła mutacje synonimiczne czyli takie, które mimo substytucji nukleotydu, nie powodują zmiany w sekwencji aminokwasowej białek. W Tabeli tej jednak w kilku pozycjach (np. 1, 4, 5, 13, 16) wskazano substytucje aminokwasów (np. K710E, T546G itp.), **proszę o wyjaśnienie dlaczego zmiany te zamieszczono wśród zmian synonimicznych.** Ciekawych obserwacji dostarczyła także analiza porównawcza badanego, polskiego szczepu szczepionkowego z BCG Pasteur. Doktorantka wykazała m.in., że wspomniana wcześniej delecja ok. 10 000 pz jest unikatowa dla polskiego szczepu szczepionkowego i nie występuje w żadnym z badanych szczepów wzorcowych.

Dyskusja pracy, podzielona na podrozdziały, została napisana bardzo dojrzale, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych.

Rozdział „Wnioski" stanowi bardzo dobre podsumowanie przeprowadzonych badań. Doktorantka wyciąga w pełni uprawnione wnioski mające podstawę w postaci przeprowadzonych analiz i danych literaturowych.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani Katarzyny Krysztopa-Grzybowskiej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki i spełnia wszystkie kryteria zawarte w ustawie z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. 2017, poz. 1789, art. 13). Wnoszę do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH o dopuszczenie Pani Katarzyny Krysztopa-Grzybowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek