



Wrocław, 23 sierpnia 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Bartosza Bednarza

„Rola białek regulatorowych CpkO i CpkN w procesie syntezy coelimycyny oraz w szlakach produkcji innych antybiotyków u *Streptomyces coelicolor* A3(2)”

Metabolity wtórne pochodzenia mikrobiologicznego są szeroką grupą związków, do której zalicza się m. in. antybiotyki, czynniki wzrostowe i cząsteczki o aktywności przeciwnowotworowej. Posiadają one bardzo dużą wartość w kontekście zastosowania terapeutycznego do leczenia ludzi lub zwierząt. Te związki są wytwarzane głównie na drodze aktywacji klastrów genów (nieaktywnych w normalnych warunkach). Pomimo tego jak ważne są to cząsteczki, niewiele wiadomo o regulacji ich ekspresji. Poznanie molekularnych mechanizmów kontrolujących wytwarzanie metabolitów wtórnych ma ogromne znaczenia dla efektywności ich wytwarzania w procesach technologicznych. Praca doktorska mgra Bartosza Bednarza dotyczy poznania białek regulatorowych biorących udział w procesie syntezy coelimycyny oraz zidentyfikowania ścieżek produkcji innych antybiotyków, będących pod bezpośrednią lub pośrednią kontrolą tych samych regulatorów w *Streptomyces coelicolor*. Badania zostały wykonane w bardzo dobrym Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów IITD pod opieką dra hab. Jacka Rybki oraz promotora pomocniczego dra Krzysztofa Pawlika.

Recenzowana praca liczy 95 stron i została napisana w języku angielskim. Do pracy został dołączony, liczący 37 stron, załącznik, którego większość stanowią wyniki analiz proteomicznych. Wstęp pracy liczy 20 stron. Autor rozprawy rozpoczyna go przedstawiając obiekt, na którym prowadził badania, czyli bakterię *Streptomyces coelicolor*. Omawia kolejno procesy różnicowania i morfogenezy, następnie budowę genomu, zwracając szczególną uwagę na olbrzymią ilość genów regulatorowych. W kolejnej części tego rozdziału przedstawia syntezę metabolitów wtórnych, koncentrując się na opisanu syntezy antybiotyków oraz wybranych elementów regulujących ich powstawanie, w tym czynników sigma, dwukomponentowych systemów transdukcji sygnału, białek TetR oraz SARP. W końcowej części rozdziału, doktorant opisuje odkrycie coelimycyny, klaster genów odpowiadających za jej biosyntezę oraz poznane do tej pory mechanizmy kontrolujące jej syntezę.

Wstęp jest napisany dobrze, a przedstawione informacje są aktualne. Autor rozprawy w sposób skrótowy przedstawił skomplikowane mechanizmy regulatorowe oraz genetyczne podstawy syntezy metabolitów wtórnych. Ten rozdział zawiera wszystkie istotne elementy, pozwalające zrozumieć problem badawczy, który postawił sobie autor recenzowanej pracy.

Celem pracy było poznanie mechanizmów regulujących syntezę coelimityny. Zasadniczą rolę w tym procesie pełnią dwa białka CpkO i CpkN i na analizie ich aktywności autor pracy skupił swoją uwagę.

Rozdziały Materiały oraz Metody są napisane dobrze, ale czasami zbyt oszczędnie. Bardzo przypominają w swojej formie opisy zamieszczane w publikacjach, które, ze względu na ograniczoną ilość miejsca, są zazwyczaj napisane skrótowo.

Do najważniejszych wyników przedstawionych w rozprawie Pana mgra Bednarza zaliczam:

- otrzymanie szczepów *S. coelicolor* A3(2) z delecją genu *cpkO* oraz mutantu z przerwaniem ciągłości genu *cpkN*. Mutanty zostały otrzymane z użyciem konstruktów kosmidowych a ich poprawność zweryfikowana za pomocą PCR. Celem potwierdzenia, że otrzymane szczepy są prawidłowe, w kolejnym kroku doktorant otrzymał szczepy komplementacyjne. Dodatkowo skonstruowany został szczep ze zmienioną sekwencją promotorową w genie  $\Delta cpkN$  oraz szczepy z lucyferazą, pozwalające na ocenę relatywnego poziomu transkrypcji wybranych genów. Otrzymane szczepy zostały następnie scharakteryzowane pod względem fenotypowym;
- przeprowadzenie szerokiej analizy proteomicznej otrzymanych szczepów. W pierwszym kroku zidentyfikowane zostały peptydy pochodzące z 36% proteomu, dalsza analiza potwierdziła obecność 1862 białek, z których 489 wykazywało statystycznie istotną różnicę pomiędzy szczepami. Większość zmian dotyczyła białek biorących udział w syntezie metabolitów wtórnych, ale niespodziewanie zidentyfikowano również białka odpowiedzialne za podstawowe procesy metaboliczne. Otrzymane wyniki ujawniły nie tylko zmiany w klastrze odpowiedzialnym za syntezę coelimityny, ale również undecylprodigiozyny i antybiotyku zależnego od wapnia;
- ustalenie profili transkrypcji wybranych genów klastra *cpk*. Doktorant użył systemu reporterowego opartego na lucyferazie, aby przeprowadzić analizę ekspresji dziewięciu wybranych białek w typie dzikim *S. coelicolor* oraz z delecją genu *cpkO* i przerwaniem ciągłości genu *cpkN*. Pomiary były prowadzone przez 110 h poprzez odczyt luminescencji co 30 min. Generalnie, doktorant zaobserwował zgodność z wynikami proteomicznymi. Analiza danych dostarczyła dodatkowych obserwacji dla genów odpowiedzialnych za

biosyntezę, syntezę butanolidów oraz regulatorowych, które pozwoliły szerzej spojrzeć na aktywność białek CpkO i CpkN.

Dyskusja jest ciekawa, autor rozprawy przedstawia krytycznie otrzymane przez siebie wyniki i porównuje je z danymi literaturowymi. Opracowanie skomplikowanych relacji pomiędzy elementami regulatorowymi i efektorowymi wymaga szerokiej wiedzy i dobrego zrozumienia tematu. Autor rozprawy udowodnił, że potrafi to zrobić. Ponadto wykazał się znajomością literatury pokazując, analogicznie skomplikowane relacje dla biosyntez innych metabolitów wtórnych.

Otrzymane wyniki pozwoliły mgr. Bednarzowi zaproponować dokładniejszy mechanizm regulacji syntezy coelimity. W ramach swojej pracy potwierdził, że białko CpkO jest głównym aktywatorem klastra *cpk* natomiast białko CpkN jest odpowiedzialne za aktywację genu *scoT*, kodującego tioesterazę typu II, niezbędną do produkcji coelimity. Ponadto autor rozprawy wykazał, że białka regulatorowe CpkO i CpkN wpływają na inne szlaki biosyntezy – aktynorodyny, undecylprodigiozyny i antybiotyku zależnego od wapnia.

Praca jest napisana starannie. Znalazłem tylko kilka błędów w tekście. Rozprawa jest bardzo skondensowana, liczy tylko 95 stron razem z literaturą, to sprawia pewien niedosyt przy jej czytaniu. Czasami wato napisać trochę szerzej, dając więcej wskazówek dla kolejnych pokoleń młodych badaczy.

Mam kilka pytań:

1. Czy analizy MS były wykonywane przez autora rozprawy osobiście?
2. Zdjęcia na figurach 1, 4, 5, 6 zostały wykonane przez autora czy zaczerpnięte z innych prac?
3. Ponieważ niepowodzeniem zakończyły się próby otrzymania białek CpkO i CpkN jak i ich fragmentów, czy jest możliwe, że są to białka natywnie rozwinięte (*ang. natively unfolded*) lub że ich fragmenty są w stanie rozwiniętym? W takim przypadku, bardzo trudno jest otrzymać rekombinowane białko w systemie bakteryjnym. Czy były próby użycia do nadprodukcji systemów eukariotycznych? Potwierdzenie wyników opisanych w rozprawie z użyciem rekombinowanych białek miałoby istotne znaczenie.
4. Czy zmiany w aktywności szczepów komplementacyjnych mogą świadczyć, o zaburzeniach w genomie (na etapie wprowadzona delekcji lub otrzymania rewertanta)? Na ile autor rozprawy może być pewien otrzymanych wyników? Jak można

by potwierdzić, że przeprowadzone operacje genetyczne nie wprowadziły niepożądanych zmian w genomie?

5. Czy były prowadzone próby potwierdzenia poczynionych w rozprawie obserwacji na poziomie oznaczenia metabolitów? Byłoby to dobrym potwierdzeniem obserwacji pochodzących z analiz proteomicznych.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgra Bartosza Bednarza „Rola białek regulatorowych CpkO i CpkN w procesie syntezy coelimycyny oraz w szlakach produkcji innych antybiotyków u *Streptomyces coelicolor* A3(2)” jest wysoce pozytywna. Autor pracy zastosował bardzo nowoczesne narzędzia badawcze, co sprawiło, że otrzymane w rozprawie obserwacje zostały dobrze opublikowane. Pomimo wielu lat badań, zarówno mechanizmy kontroli syntezy, jak i rola metabolitów wtórnych (w tym antybiotyków) jest bardzo słabo poznana. Praca wykonana przez mgra Bartosza Bednarza dostarczyła wartościowych wyników w tym obszarze.

Rozprawa doktorska mgra Bartosza Bednarza spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie mgra Bartosza Bednarza przez Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze poziom przedstawionej pracy oraz fakt opublikowania jej wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

*Danul Koorel*