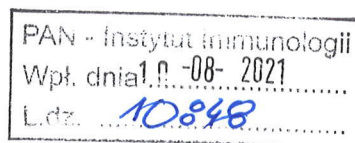


80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 59, tel +48-58- 5236056 e-mail: joanna.skorko-glonek@ug.edu.pl

Prof. dr hab. Joanna Skórko-Glonek
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
NIP: 584-020-32-39

Gdańsk, 06.08.2021.



Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr. Bartosza Bednarza
zatytułowanej: „Rola białek regulatorowych CpkO i CpkN w procesie syntezy
coelimycyny oraz w szlakach produkcji innych antybiotyków u *Streptomyces
coelicolor* A3(2)”

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, z dnia 11 marca 2021 r.

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod kierunkiem dr. hab. Jacka Rybki oraz dr. Krzysztofa Pawlika.

Rozprawę doktorską stanowi przygotowana w języku angielskim praca pisemna o klasycznym układzie, z wyodrębnionymi głównymi częściami: Introduction (22 str.), Aims of this work (1 str.), Materials and methods (26 str.), Results (19 str.), Discussion (7 str.). Na początku pracy zostały umieszczone streszczenia w języku angielskim i polskim oraz listy figur, tabel i skrótów. Na końcu rozprawy znajduje się spis odnośników literaturowych oraz obszerny aneks (36 str.).

Oceniana rozprawa dotyczy analizy funkcjonalnej dwóch białek regulatorowych, CpkO i CpkN, u bakterii *Streptomyces coelicolor* A3(2). Tematyka rozprawy doskonale się wpisuje w nurt badań prowadzonych od wielu lat w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda



PAN we Wrocławiu. Właśnie tam został zidentyfikowany antybiotyk coelimycyna, poliketydowy metabolit wtórny *S. coelicolor*, o niepoznanej do tej pory funkcji.

Gram dodatnie bakterie z rodzaju *Streptomyces*, należące do promieniowców (*Actinobacteria*), są podstawowym źródłem antybiotyków oraz wielu innych substancji o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym. W związku z tym podjęcie badań zmierzających do poszerzenia wiedzy na temat regulacji syntezy coelimycyny uważam za zasadne, a uzyskane wyniki mogą potencjalnie znaleźć praktyczne zastosowanie.

Badania Doktoranta skupiły się na dotąd słabo scharakteryzowanych białkach regulatorowych, których funkcja wydawała się być ograniczona wyłącznie do genów zawartych w klastrze *cpk*, obejmującym m.in. gen kodujący coelimycynę.

Streszczenie (oraz „Abstract”) w sposób syntetyczny przedstawia tematykę rozprawy i jej cele oraz opisane w rozprawie wyniki.

Rozdział „**Introduction**” stanowi dobre wprowadzenie w zagadnienia związane z tematyką rozprawy. Pierwsza część wstępu zawiera ogólną charakterystykę rodzaju *Streptomyces* oraz zwięzły opis gatunku *S. coelicolor*, który był modelem badawczym Doktoranta. Następnie Autor skupił się na wtórnych metabolitach *S. coelicolor*, z których w wyczerpujący sposób zostały przedstawione cztery antybiotyki produkowane przez szczep *S. coelicolor* A3(2): aktynorodyna, undecylprodigiozyna, antybiotyk zależny od wapnia i coelimycyna. Obszerna część wstępu została poświęcona także regulacji wtórnego metabolizmu u *Streptomyces* oraz szlakowi biosyntezy coelimycyny i jego regulacji.

Wstęp został napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały. Do pełnego komfortu zabrakło mi schematów obrazujących przykładowe mechanizmy regulacyjne u *S. coelicolor*.

Podsumowując, rozdział ten porusza zakres tematyczny odzwierciedlający przedmiot badań Doktoranta i zagadnienia poruszane w dyskusji. Należy więc uznać wybór omawianych tematów za zasadny i niezbędny do właściwego wprowadzenia czytelnika do dalszych rozdziałów rozprawy.

Rozdział „**Materials and methods**” w sposób wyczerpujący i generalnie pozwalający na powtórzenie badań przedstawia zbiór materiałów wykorzystanych w pracy i protokołów wykonanych doświadczeń. Zwłaszcza opisy prowadzenia hodowli bakteryjnych i manipulacji genetycznych są przedstawione bardzo szczegółowo.

Niestety, w części tej zabrakło opisu metody EMSA (electrophoretic mobility shift). Ponadto uważam, że skład roztworów jest bardziej jednoznaczny jeżeli są podane stężenia składników, a nie ich ilość.

Cel pracy został jasno określony, zarówno w tytule rozprawy, jak i dedykowanym rozdziale dysertacji. Nadrzędnym celem pracy było poznanie regulacji syntezy coelimycyny przez czynniki transkrypcyjne CpkO i CpkN, kodowane przez klaster *cpk*. Zostały także postawione cele szczegółowe, obejmujące analizę sekwencji aminokwasowych CpkO i CpkN, uzyskanie i scharakteryzowanie szczepów bakteryjnych pozbawionych genów *cpkO* i *cpkN*, przeprowadzenie analizy proteomicznej w/w szczepów i zbadanie profilu ekspresji genów klastra *cpk* w szczepach mutantów.

Wszystkie wymienione cele szczegółowe zostały pomyślnie zrealizowane, co zostało wyczerpująco przedstawione w części opisującej wyniki.

W rozdziale „**Results**” Doktorant przedstawił skrupulatną analizę sekwencji aminokwasowej białek CpkN i CpkO. Pozwoliło mu to wyodrębnić w każdym białku dwie domeny typowe dla rodziny białek regulatorowych syntezy antybiotyków u *Streptomyces* (SARP), domeny HTH i BTAD. Ponadto Autor zaproponował obecność w białku CpkO potencjalnej domeny cyklazy mononukleotydu. Ta obserwacja jest bardzo ciekawa, gdyż wskazuje na możliwość udziału CpkO w sygnalizacji komórkowej z wykorzystaniem cyklicznych mononukleotydów jako cząsteczek sygnałowych. W tym miejscu mam pytanie do Doktoranta: czy były podjęte próby identyfikacji aktywności cyklazy w białku CpkO? U *Streptomyces* funkcja Crp-cAMP nie wydaje się być związana z represją kataboliczną. Uważa się natomiast, że Crp-cAMP bezpośrednio aktywuje geny antybiotyków i innych wtórnych metabolitów, włączając coelimitynę. Czy Doktorant uważa, że CpkO mogłoby brać udział w regulacji zależnej od cAMP (lub innego wtórnego przekaźnika)?

Niepowodzeniem skończyły się próby identyfikacji sekwencji DNA rozpoznawanych przez CpkO i CpkN. Nie udało się uzyskać odpowiedniej ilości białek CpkO i CpkN w komórkach *S. coelicolor*, a żadne z rekombinowanych białek produkowanych w systemie *E. coli* nie wiązało się do DNA w zastosowanych warunkach doświadczalnych. W tej sytuacji Doktorant postawił hipotezę, iż możliwą przyczyną braku wiązania rekombinowanych białek do DNA jest ich niewłaściwa struktura lub brak odpowiednich ligandów. Czy były podjęte próby identyfikacji ligandów białek CpkO i CpkN? Niestety, ze względu na brak opisu wykonania doświadczenia EMSA trudno się ustosunkować do możliwych technicznych przyczyn niepowodzenia.

Dalsze badania były prowadzone z wykorzystaniem zmutowanych szczepów, niezdolnych do syntezy białek CpkO lub CpkN, oraz odpowiednich szczepów komplementacyjnych. Nie jest dla mnie zrozumiałe, dlaczego w jednym przypadku przeprowadzono delecję genu ($\Delta cpkO$), a w drugim ciągłość genu została przerwana (*cpkN*), prowadząc do jego inaktywacji. Należy też zwrócić uwagę, że nie powinno się stosować terminu delecja w przypadku przerwania ciągłości genu. W związku z tym używany przez Autora zapis $\Delta cpkN$ należałoby odpowiednio zmienić.

Za szczególne osiągnięcia Doktoranta uważam wykazanie, iż zarówno CpkO, jak i CpkN są aktywatorami niezbędnymi do syntezy coelimityny, a także wykrycie powiązań funkcji tych białek regulatorowych z metabolizmem innych aminokwasów i niektórymi szlakami metabolizmu podstawowego. Wyniki te zostały uzyskane przy zastosowaniu różnorodnych technik, począwszy od badań fenotypowych zmutowanych szczepów, po badania proteomiczne i transkryptomyczne. Proteomika różnicowa stanowi bardzo obszerną część pracy. Doktorant przeprowadził bardzo wnikliwe porównanie proteomów zmutowanych bakterii *S. coelicolor* $\Delta cpkO$, *cpkN* ze szczepem kontrolnym, stosując trzy metody analityczne: XIC (extracted ion chromatograms), SC (spectral counting) oraz PC (peak counting). Mgr Bednarz zaobserwował, że w zmutowanych szczepach zmieniony poziom wykazują przede wszystkim białka związane z wtórnym metabolizmem. W proteomie szczepu $\Delta cpkO$ nie występowały białka kodowane w obrębie klastra *cpk*, natomiast poziom białek związanych z syntezą undecylprodigiozyny oraz antybiotyku zależnego od wapnia silnie wzrósł. Efekty braku funkcjonalnego genu *cpkN* były

bardziej rozbieżne. W proteomie *cpkN* nie występowało białko ScoT, kodujące tioesterazę niezbędną do prawidłowego działania szlaku biosyntezy coelimycyny, natomiast poziom pozostałych białek kodowanych przez klastę *cpk* był podwyższony. Białka klastra biosyntezy antybiotyku zależnego od wapnia występowały na obniżonym poziomie, natomiast w przypadku klastra biosyntezy undecylprodigiozyny Doktorant nie zaobserwował wyraźnego trendu.

W zmutowanych szczepach także niektóre białka związane z metabolizmem podstawowym miały zmieniony poziom w stosunku do szczepu kontrolnego. Zjawisko to dotyczyło przede wszystkim białek związanych z przemianą tłuszczu. W szczepie $\Delta cpkO$ występował niższy poziom białek biosyntezy, a wyższy rozkładu lipidów. Odwrotny trend został zaobserwowany w szczepie *cpkN*. Wśród istotnych białek o zmienionym poziomie należy wymienić karboksylazę acetylo-CoA, enzymu odpowiedzialnego za powstawanie malonylo-CoA, kluczowego prekursora zarówno kwasów tłuszczowych, jak i poliketydów. Obserwacje te wskazują na możliwość zaburzeń w metabolizmie tłuszczu w zmutowanych komórkach. Czy faktycznie takie zaburzenia mogą występować? Jeśli tak, to czy mogą mieć wpływ na wzrost zmutowanych komórek i wrażliwość na warunki stresowe (np. poprzez zmiany własności błony komórkowej)?

W pracy zabrakło wzmianki o współpracy z francuskim zespołem z Micalis Institute (INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, Francja) przy wykonywaniu i analizie badań proteomicznych. Dopiero z lektury publikacji Pana mgr. Bednarza (Bednarz et al. 2021. Front. Microbiol. 12:616050. doi: 10.3389/fmicb.2021.616050) można się dowiedzieć, jaki był jego udział w tej części badań. Uważam, że zaznaczenie faktu osobistego wykonania i analizy doświadczeń proteomicznych jest warte podkreślenia w związku z rutynowym zlecaniem tego typu badań firmom zewnętrznym.

Bardzo dobrym uzupełnieniem badań proteomicznych były analizy poziomu ekspresji z promotorów genów klastra *cpk*. Doktorant wykorzystał w tym celu układ reporterowy lucyferazy, pozwalający na monitorowanie zmian aktywności poszczególnych promotorów w czasie. Uzyskane wyniki były zgodne z danymi proteomicznymi. Usunięcie genu *cpkO* spowodowało zanik transkrypcji z analizowanych promotorów, potwierdzając nadrzędną rolę CpkO w regulacji ekspresji genów klastra *cpk*. Natomiast ekspresja genu *scoT* była zahamowana w tle mutacji *cpkN*. W związku z tym Doktorant postawił hipotezę, iż CpkN jest aktywatorem genu *scoT*. Pragnę jednak zwrócić Doktorantowi uwagę, iż zastosowana przez niego metoda nie pozwala na bezpośredni pomiar poziomu transkrypcji, lecz obrazuje aktywność produktu genu reporterowego (pomiar luminescencji). W związku z tym sugerowałabym Autorowi użycie innego terminu niż „transkrypcja” w wielu miejscach sekcji 4.6. Także tytuł figury 16 „Transcriptional profiles of *cpk* cluster genes” nie oddaje w pełni treści wykresów.

Podsumowując tę część pracy uważam, że Pan mgr Bednarz uzyskał bardzo interesujące wyniki, które znacząco pogłębiły wiedzę na temat regulacji syntezy antybiotyków u *S. coelicolor*. O randze wyników świadczy m.in. fakt opublikowania ich w dobrym czasopiśmie naukowym „Frontiers in Microbiology” (IF=5,640, Q1).

W rozdziale „**Discussion**” Doktorant odniósł się do uzyskanych wyników i przeprowadził ich analizę. W pierwszej kolejności Doktorant przedstawił uaktualniony model regulacji klastra biosyntezy coelimityny, w którym geny są aktywowane kaskadowo. W dalszej części Autor dyskutuje rolę białek CpkO i CpkN jako plejotropowych regulatorów szlaków metabolizmu wtórnego, ze szczególnym uwzględnieniem szlaków biosyntezy antybiotyków. Za bardzo ciekawe uważam rozważania Doktoranta na temat powiązań funkcji białek CpkO i CpkN ze szlakami metabolizmu podstawowego. Autor proponuje, iż zwiększona synteza undecylprodigiozyny w mutancie $\Delta cpkO$ znajduje między innymi uzasadnienie w wysokim poziomie acetylo-CoA pochodzącego z rozkładu kwasów tłuszczowych. Jednakże poziom karboksylazy acetylo-CoA spada w mutancie $\Delta cpkO$. Jak Doktorant wytłumaczy tę rozbieżność?

Sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na znajomość tematyki badawczej i umiejętność umieszczenia danych eksperymentalnych w szerszym kontekście. Zabrakło mi natomiast krótkiego podsumowania, wyliczającego najważniejsze osiągnięcia i spinającego przedstawione w pracy wyniki i ich dyskusję. Oczywiście umieszczanie takiego rozdziału nie jest obowiązkowe, ale pozwala na wypunktowanie najważniejszych osiągnięć i sformułowanie końcowych wniosków.

Liczący 134 pozycje rozdział „**References**” zawiera zestaw publikacji związanych z tematyką dysertacji i użytą metodyką. Są to prace datowane przede wszystkim po 2005 roku, aczkolwiek nie zostały pominięte prace pionierskie o znaczeniu historycznym.

Na końcu dysertacji znajduje się obszerny **aneks** („Appendix”), zawierający m.in. listę białek zidentyfikowanych metodą spektrometrii mas oraz porównanie poziomu wszystkich zidentyfikowanych białek w analizowanych proteomach.

Uwagi ogólne

Praca jest napisana w sposób klarowny i logiczny, zwięźle, bez zbędnych dygresji, ale równocześnie z wystarczającą ilością szczegółów. Drobnie błędy językowe i edytorskie nie zaburzają lektury pracy. Tekst wzbogacają ryciny (17 w części głównej i 8 w aneksie) oraz tabele (5 w części głównej i 2 w aneksie). Część figur zyskałaby poprzez uzupełnienie opisów. Dotyczy to w szczególności schematów przedstawionych na rycinach nr 2, 3 i 9. Oczywiście czytelnik znajdzie odpowiednie informacje w tekście pracy, niemniej dołączenie choćby krótkiego opisu znacznie ułatwiłoby zapoznanie się z treścią figur. Ponadto rycina nr 9 nie w pełni obrazuje proces regulacji syntezy coelimityny opisany w tekście sekcji 1.4.3. Linie reprezentujące blokadę ekspresji genów nie wskazują precyzyjnie właściwych genów.

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko i wspomniane powyżej uchybienia nie umniejszają wartości pracy. Na uznanie zasługuje bogactwo technik, którymi się posługiwał Doktorant w czasie wykonywania doświadczeń. Badania zostały przeprowadzone w sposób kompetentny z zastosowaniem właściwie dobranej metodologii badawczej. Przedstawione wyniki są opisane zasadniczo poprawnie i w wielu przypadkach stanowią podstawę do uściślenia hipotez i planowania dalszych badań. Przeprowadzona dyskusja świadczy o głębokiej wiedzy Doktoranta i jego umiejętności skonfrontowania rezultatów własnych badań z danymi literaturowymi. Wnioski wyciągnięte przez Autora z wyników badań są wyważone i

nie znajduję w nich nadinterpretacji. Nie mam w związku z tym wątpliwości, iż Pan mgr Bartosz Bednarz dobrze opanował warsztat naukowy w zakresie mikrobiologii, biologii molekularnej i biochemii. Przedstawione w rozprawie wyniki stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i są cennym uzupełnieniem wiedzy na temat regulacji syntezy antybiotyków u *S. coelicolor*.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona rozprawa całkowicie spełnia wszystkie warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgr. Bartosza Bednarza do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy rozprawy oraz opublikowanie części wyników w dobrym recenzowanym czasopiśmie naukowym, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Gdovisk, 6.08.2021

Joana Skótko-Głomer