



RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Bednarza pt. „ The functions of CpkO and CpkN regulators in coelimirin synthesis and other antibiotic production pathways in *Streptomyces coelicolor* A3(2), przygotowana na zlecenie Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Promotorem ocenianej rozprawy doktorskiej, wykonanej w Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów w/w Instytutu jest dr hab. Jacek Rybka, kopromotorem dr Krzysztof Pawlik. Przedstawiona praca doktorska dotyczy niezwykle ważnych i aktualnych zagadnień z zakresu biologii, organizacji genomu i kontroli metabolizmu bakterii z rodzaju *Streptomyces coelicolor* A3(2). Promieniowce te są używane w przemyśle przy produkcji leków i stanowią obiekt zainteresowań i badań naukowych prowadzonych w Instytucie od wielu lat.

Prezentowana praca doktorska jest napisana w języku angielskim, składa się sześciu rozdziałów: Wstępu, Celu Badań, Materiału i Metod, Wyników, Dyskusji, Wykazu Źródeł Literaturowych i Załącznika z kompletnymi wynikami badań.

Całość jest logicznie powiązana i umożliwia dogłębne śledzenie sposobu realizacji założonych celów badawczych.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej.

Rosnąca z roku na rok liczba mikroorganizmów wykazujących wysoki poziom lub całkowitą niewrażliwość na antybiotyki jest poważnym problemem w terapii chorób zakaźnych. Dlatego na poszukiwanie nowych efektywniej działających związków antybiotycznych lub modyfikacje strukturalne podnoszące ich aktywność przeciwbakteryjną są przeznaczane ogromne środki i przez to często stają się dominującym kierunkiem badań czołowych placówek naukowych i laboratoriów

naukowych na świecie. Podjęty przez doktoranta temat doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy i stanowi ważne uzupełnienie wiedzy związanej z mechanizmami kontroli syntezy antybiotyków w szczepie *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Wstęp w sposób zwięzły i klarowny przedstawia aktualną wiedzę w zakresie charakterystyki rodzaju *Streptomyces* jego fizjologii i metabolizmu, wytwarzanych związków o aktywności antybiotycznej, systemów kontroli tworzenia wtórnych metabolitów ze szczegółowym omówieniem szlaku biosyntezy koelimity. Podane we wprowadzeniu informacje pozwalają na obiektywną ocenę zakresu, celowości i ważności podjętych przez doktoranta badań,

Cel badań szczegółowo określa kolejne etapy realizacji zadań badawczych i oczekiwania czy i w jakim stopniu pozwolą one na uzyskanie odpowiedzi potwierdzających hipotezy formułowane przez autora o istotnej roli białek CpkO i CpkN w procesie regulacji syntezy koelimity. Projekt badań sformułowany przez doktoranta obejmował:

- Określenie sekwencji aminokwasowej białek CpkO i CpkN
- Uzyskanie mutantów delecyjnych w obszarach genu *cpkO* i *cpkN*
- Charakterystyka fenotypowa mutantów delecyjnych w obszarach genu *cpkO* i *cpkN* w zakresie zdolności i poziomu tworzenia koelimity, aktynorodyny i undecylprodigiosyny.
- Analizę proteomiczną szczepów mutantów CpkO i CpkN w zakresie wpływu białek CpkO i CpkN na szlaki syntezy koelimity i innych związków antybiotycznych.
- Profilowanie ekspresji genów *cpkN* w mutantach i szczepie dzikim M145 *in vivo* przy użyciu systemu reporterowego opartego na lucyferazie.

Materialy i Metody

Dobór metod prawidłowy, świadczy o doskonałej znajomości nowoczesnych technik badawczych i umiejętnościach ich stosowania.

Wyniki.

Autor konsekwentnie zrealizował założone etapy badań. Wykazał, że białko CpkO składa się z 543 aminokwasów, białko CpkN zbudowane z 281 aminokwasów i pełni kluczową rolę w regulacji syntezy koelimity. Ze względu na niemożność uzyskania funkcjonalnych białek CpkO i CpkN i określenia ich interakcji z DNA dalsze badania prowadzone były *in vivo*.

Dalsza eksperymentalna część pracy była prowadzona z użyciem mutantów *Streptomyces coelicolor* A3(2), z delecją w genie *cpkO* lub uszkodzonym *cpkN*. Autor wykazał, że szczepy te nie były zdolne do syntezy koelimity. Białka CpkO i CpkN regulują syntezę antybiotyku poprzez bezpośrednią aktywację ekspresji genów *cpkO* i *cpkN*. Przywrócenie produkcji koelimity obserwowano po wprowadzeniu do szczepu *Streptomyces coelicolor* A3(2) kompletnych, funkcjonalnych genów *cpkO* i *cpkN* z aktywnymi promotorami. Kolejną ważną obserwacją było wykazanie powiązania pomiędzy zahamowaniem syntezy koelimity i nadprodukcją tworzonej undecyloprodigiozyny. Także poziom syntezy antybiotyków zależnych od wapnia ulegały zmianie w zależności od tego czy był aktywny gen *cpkN* czy też delecja powodowała dezaktywację genu *cpkO*.

Złożoność procesów metabolicznych w zakresie funkcjonowania systemów regulacji transkrypcji genów *cpk* jest widoczna w trakcie oceny i interpretacji rezultatów eksperymentów *in vivo* dotyczących profilowania ekspresji zespołów tych genów przy użyciu systemu lucyferazy. Delecja genu *cpkO*, który jest częścią jednostki transkrypcyjnej genów *cpk* prowadzi do ustania transkrypcji dla wszystkich czterech genów szlaku biosyntezy i dwóch genów regulatorowych *cpkN* i *scbR2*. Autor zakłada, że białko CpkO działa na innym wyższym poziomie i aktywuje inne geny regulatorowe.

Podsumowanie. Oceniana praca doktorska stanowi istotny wkład w szczegółowe poznanie biologii szczepu *Streptomyces coelicolor* A3(2), szlaków metabolicznych i systemów kontroli biosyntezy koelimity. Doktorant zrealizował zamierzony cel badań, sformułowane przez siebie hipotezy potwierdził wynikami przemyślanych, logicznie przeprowadzonych badań eksperymentalnych, przy wykorzystaniu nowoczesnych metod i doskonale je zinterpretował prezentując doskonałą znajomość światowej literatury naukowej i dojrzałość naukową. Autor oceniając wartość i znaczenie swoich wyników na pierwszym miejscu wymienia określenie roli białka CpkO jako aktywatora zespołu genów *cpk* poprzez jego oddziaływanie na transkrypcję i białka CpkN wzbudzającego syntezę tioesterazy typu II przez gen *scoT*. Równie ważne jest wykazanie, że blokowanie syntezy koelimity skutkuje nadprodukcją undecyloprodigiozyny i antybiotyku zależnego od wapnia. Jeżeli podobne zależności występują u innych producentów antybiotyków może to w przyszłości otworzyć nowe kierunki badań, umożliwiając regulację syntezy substancji antybiotycznych.

W mojej opinii praca ma wysoką wartość merytoryczną i aplikacyjną, może stanowić podstawę dla rozwijania badań w tym zakresie. Jest dobrze napisana, literatura dobrana

właściwie a sformułowane wnioski w pełni znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Bartosza Bednarza pt. „The functions of CpkO and CpkN regulators in coelimidin synthesis and other antibiotic production pathways in *Streptomyces coelicolor* A3(2) jest bardzo dobra i wnioskuję o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.

Praca doktorska w przedłożonej do oceny wersji spełnia wszystkie wymogi określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym (Dz U. 2018 pz 1668 z dnia 20 lipca 2018 z późn. zm.) i stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Bartosza Bednarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Prof. dr hab. n. biol. Włodzimierz Doroszkiewicz

