

WYDZIAŁ
BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Uniwersytet Łódzki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Zakład Genetyki Drobnoustrojów

Łódź, 21.06.2014

Dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ

Ocena rozprawy doktorskiej mgra Marcina Jana Szafrana pt. „Wysokoprocenywna topoizomeraza I ze *Streptomyces coelicolor* – dynamika procesu relaksacji DNA oraz rola biologiczna enzymu”.

Pan mgr Marcin Szafran wykonał swoją pracę doktorską w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Dagmary Jakimowicz. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi dwie prace eksperymentalne opublikowane w wiodących czasopiśmie z zakresu mikrobiologii i biologii molekularnej – Journal of Bacteriology (5-letni IF – 3,586) i Nucleic Acids Research (IF – 8,055) oraz dwie prace przeglądowe opublikowane w krajowym czasopiśmie, indeksowanym na liście JCR – Postępowach Higieny i Medycyny Doświadczalnej (IF – 0,55). Łączny sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których znalazły się załączone publikacje wynosi zatem 12,74. Zbiór publikacji został poprzedzony krótkim, niespełna 2-stronnicowym streszczeniem, zarówno w języku polskim jak i angielskim. Do wydruku został również dołączony pięciostronicowy autoreferat, stanowiący dodatkowe, nieco bardziej rozbudowane streszczenie projektu doktorskiego. Przedstawione oświadczenia współautorów, wskazujące, że mgr Marcin Szafran brał udział zarówno w wykonywaniu kluczowych eksperymentów, jak i sporządzaniu dokumentacji oraz przygotowywaniu i korekcie manuskryptu, a także fakt, że we wszystkich czterech publikacjach był On pierwszym autorem (w jednym z artykułów przeglądowych dzieli pozycję pierwszego autora z drugą osobą) upoważniają mnie do stwierdzenia, że wkład Doktoranta w powstanie tych prac był dominujący i mogą one być włączone w cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską.

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź,
tel. 042-635-4772, fax 042-665 58 18
Kierownik Zakładu: dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ
tel. 042-635-44-66, e-mail: pstaczek@biol.uni.lodz.pl

Nadrzędnym celem realizowanego przez mgr. Marcina Szafrana projektu doktorskiego było poznanie mechanizmów rządzących procesem segregacji chromosomów podczas podziałów komórek promieniowców z gatunku *Streptomyces coelicolor*. Projekt ten wpisuje się w nurt długoletnich badań biologii promieniowców (*Actinobacteria*) na poziomie molekularnym, realizowanych przez zespół prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej. W odróżnieniu od większości bakterii, których chromosomalny DNA jest kowalencyjnie zamknięty, tworząc kolistą cząsteczkę, promieniowce z rodzaju *Streptomyces* posiadają linowy chromosom. Ponadto, drobnoustroje te rosną w postaci grzybni, której strzępki charakteryzują się silnym zróżnicowaniem morfologicznym i funkcjonalnym, między innymi część z nich, tworzących tzw. grzybnie powietrzną, może ulegać przekształceniu w zarodniki. Zjawisku temu towarzyszy kondensacja kilkudziesięciu chromosomów, które są następnie segregowane do nowo powstających spor, wyznaczanych przez tworzące się przegrody poprzeczne. Głównym białkiem, odpowiedzialnym za proces segregacji chromosomów, jest ParB, które rozpoznaje i wiąże się do sekwencji *parS*, szczególnie silnie reprezentowanych w regionie inicjacji replikacji *oriC*, tworząc kompleksy nukleoproteinowe, określane w literaturze jako segresomy. Punktem wyjścia projektu mgr. Marcina Szafrana stało się zidentyfikowanie, przez dr hab. Dagmarę Jakimowicz, białka o charakterze topoizomerazy I (oznaczonego później jako *ScTopA*), które rozpoznawało kompleksy ParB-DNA(*parS*). Doktorant podjął się próby scharakteryzowania właściwości biologicznych i fizykochemicznych tego enzymu, jego roli w procesie segregacji chromosomów. Dzięki znakomitemu warsztatowi doświadczalnemu, wypracowanemu w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, a także dzięki szerokim kontaktom naukowym i doświadczeniu, zarówno Promotora jak i Kierownika Zakładu, mgr Marcin Szafran miał do swojej dyspozycji niemal nieograniczone możliwości badawcze i potrafił z nich w pełni skorzystać. Na szczególne podkreślenie zasługuje wachlarz nowoczesnych technik molekularnych, jakimi ze znanostwem, sądząc po efektach, posługiwał się Doktorant (m.in. techniki konstrukcji mutantów i klonowania genów przy użyciu ukierunkowanych procesów rekombinacji, różne odmiany PCR, oczyszczanie i oznaczanie aktywności białek technikami elektroforetycznymi, chromatograficznymi, spektroskopowymi, oraz przy użyciu pułapkowania magnetycznego, immunoprecypitacja w technologii ChIP, mikroskopia fluorescencyjna). Do najważniejszych osiągnięć mgr. Marcina Szafrana, które zbiorczo można by określić jako wzbogacenie dotychczas obowiązującego modelu segregacji chromosomów bakterii z rodzaju *Streptomyces* o udział białka *ScTopA*, zaliczam zwłaszcza: a) wykazanie wiązania białka *ScTopA* w sąsiedztwie sekwencji *parS* w obecności ParB, ale nie poprzez bezpośrednie oddziaływanie z tym białkiem, co sugeruje generowanie zmian topologicznych DNA w badanym obszarze, które są następnie rozpoznawane przez *ScTopA*, b) wykazanie, że znaczące (20-krotne) obniżenie poziomu ekspresji białka *ScTopA* skutkuje zahamowaniem tempa wzrostu badanego drobnoustroju oraz zaburzeniem procesu sporulacji, prawdopodobnie na skutek konfliktu topologicznego generowanego przez białko ParB, co zostało pośrednio potwierdzone, gdyż usunięcie genu kodującego ParB przywracało prawidłowy fenotyp szczepu, c) oznaczenie właściwości biologicznych i fizykochemicznych *ScTopA*, w tym pomiarów relaksacji DNA w czasie rzeczywistym przy pomocy wysublimowanych technik badawczych.

Korzystając z wiedzy i niemałego już doświadczenia Doktoranta chciałbym w tym miejscu poprosić, czy mógłby przedstawić swój pogląd, jakiego typu zmiany topologiczne mogą być generowane przez białko ParB, że wymagają one interwencji topoizomerazy I aby umożliwić prawidłową segregację chromosomów w procesie sporulacji.

Badania przeprowadzone przez mgr. Marcina Szafrana, mające na celu scharakteryzowanie właściwości topoizomerazy TopA *S. coelicolor*, oprócz niewątpliwego waloru poznawczego, posiadają również długofalowy potencjał praktyczny. W dobie narastającego problemu lekooporności drobnoustrojów, znaczna liczba ośrodków na całym świecie poszukuje dogodnych celów dla skutecznej antybiotyko- i chemoterapii. Wśród bakterii z rodzaju *Streptomyces* obok gatunków niechorobotwórczych, jak *S. coelicolor*, występują takie patogeny takie jak *S. scabies*, *S. sudanensis* czy *S. somaliensis*, jednak znacznie ważniejszy jest fakt bliskiego pokrewieństwa tego rodzaju bakterii z mykobakteriami, wśród których szczególne znaczenie w patogenezie odgrywa *Mycobacterium tuberculosis*. Prątki gruźlicy wraz z innymi prątkami chorobotwórczymi stanowią na świecie przyczynę zgonów blisko 1,5 mln ludzi rocznie, z czego w 2012 roku ok. 170 tys. zgonów zostało spowodowanych przez prątki wielolekooporne. Wydaje się, że dla zwalczania zakażeń wywoływanych przez bakterie należące do typu *Actinobacteria*, obejmującego zarówno promieniowce jak i kwasooporne prątki, topoizomeraza I stanowi dogodny cel molekularny. W odróżnieniu od większości powszechnie występujących patogenów, duża reprezentacja przedstawicieli tej grupy drobnoustrojów posiada bowiem minimalny zestaw topoizomeraz, obejmujący gyrazę i topoizomerazę I, zapewniający prawidłową homeostazę poziomu superskręcenia DNA w komórce. Tak więc poznanie właściwości białka TopA stwarza podwaliny dla możliwości opracowania nowych, ukierunkowanych leków dla terapii antydrobnoustrojowej. Szczegółowe podstawy teoretyczne, jak również aktualny stan wiedzy na temat wykorzystania topoizomeraz jako celów dla współczesnej i przyszłej antybiotyko-terapii zostały zawarte w dwóch interesujących artykułach przeglądowych wchodzących w skład recenzowanej rozprawy doktorskiej i stanowiących logiczne uzupełnienie prac eksperymentalnych.

W zasadzie, reputacja czasopism w których swoje prace, szczególnie te eksperymentalne, opublikował mgr Marcin Szafran, zapewniany przez ich redakcje skrupulatny, rzetelny proces recenzji, realizowany przez najwybitniejszych fachowców z odpowiednich dyscyplin naukowych, zwalnia mnie z obowiązku dalszej, szczegółowej analizy przedłożonych materiałów, jednakże z przywileju recenzenta, a także ze względów dydaktycznych, chciałbym zwrócić uwagę Doktoranta na kilka zagadnień.

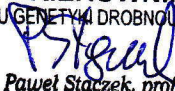
W swojej pracy przeglądowej dotyczącej roli biologicznej topoizomeraz typu I mgr Marcin Szafran pisze, że „...rozmięszczenie domen na konkretnych etapach cyklu komórkowego wydaje się stałe...”. Stwierdzenie to wydaje mi się nie do końca precyzyjne, myślę, że jest to pewien skrót myślowy, wynikający z asocjacji danych na temat zachowania domen superhelikalnych oraz lokalizacji poszczególnych foci w obrębie makrodomen chromosomalnych w trakcie cyklu życiowego niektórych gatunków bakterii. Prosiłbym zatem Doktoranta o rozwinięcie tego zagadnienia podczas publicznej obrony. Nie do końca zgadzam się też ze stwierdzeniem, że „...ekspresja tych genów jest zahamowana, gdy chromosom znajduje się w stanie zrelaksowanym (relaxation-repressed genes)”. O ile w wersji angielskiej mamy tryb niedokonany (w wolnym tłumaczeniu moglibyśmy powiedzieć „do represji

dochodzi w trakcie relaksacji” co jest poprawne), o tyle w tekście polskim powyższe stwierdzenie sugeruje, że chromosom (bądź jego niektóre domeny) znajduje się w formie zrelaksowanej, a zatem pozbawionej superskręcenia, co nie jest prawdą. Zawiera on wyłącznie obszary o nieco mniejszej, negatywnej gęstości superhelikalnej, co jest wystarczające do zahamowania transkrypcji z wrażliwych promotorów. Ponadto, nie udało mi się znaleźć odpowiedniej pozycji bibliograficznej na temat udziału białka Fis w organizowaniu mikrodomen. Cytowana publikacja nr 65 dotyczy zupełnie innego zagadnienia.

W odniesieniu do publikacji z J. Bacteriology, chciałbym na przyszłość zasugerować Doktorantowi, aby do analiz dystrybucji topoizomerów plazmidu reporterowego (rycina 2C) izolowanego z indukowanego szczepu stosować rozdział elektroforetyczny w obecności interkalatora, np. chlorochinoliny. O ile w badaniach *in vitro* zmiany topologii DNA w obecności topoizomeraz są zazwyczaj wyraźnie widoczne i następuje szybki ubytek bądź przyrost superskręconej formy DNA (w zależności od rodzaju zastosowanej topoizomerazy), o tyle zmiany topologii zachodzące *in vivo* bywają bardziej subtelne, w związku z tym poprawienie rozdzielczości techniki w obszarze frakcji superskręconego DNA, poprzez dodatek interkalatora, może przynieść interesujące informacje. Nie bardzo rozumiem stosowanie liczby mnogiej „gyrases” zwłaszcza zestawieniu tego określenia w formę „Topoisomerases of class I and II (gyrases)...” gdyż sugeruje to, że Topo II i gyraza to synonim, a ponadto, występuje więcej niż jeden tego typu enzym w komórce.

Z kolei w oświadczeniach współautorów dotyczących artykułu przeglądowego nt. inhibitorów replikacji porządek autorów jest niezgodny z obowiązującym w oryginalnej publikacji.

Te drobne uwagi oczywiście w żadnym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny prezentowanej rozprawy mgr. Marcina Jana Szafrana, zatem z pełnym przekonaniem stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane współczesnym pracom doktorskim. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na Jego wkład pracy, a także oryginalność wyników i bardzo wysoki merytoryczny poziom, przekładający się na publikacje w renomowanych czasopismach naukowych, przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
ZAKŁADU GENETYKI DROBNOUSTROJÓW UŁ

dr hab. Paweł Stączek, prof. nadzw. UŁ