



## SPOŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

Łódź, 25. 10. 2016

**Prof. dr hab. Adam Jaworski**

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego  
obecnie

Prof. zw. Społecznej Akademii Nauk w Łodzi

Dyrektor Instytutu Nauk o Zdrowiu

Łódź, ul. Gdańska 121

### **Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Skut**

**pt. „Wpływ poziomu topoizomerazy I na cykl komórkowy *Mycobacterium smegmatis*”**

Praca doktorska Pani mgr Patrycji Skut pt. „*Wpływ poziomu topoizomerazy I na cykl komórkowy Mycobacterium smegmatis*” została w pełni zrealizowana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod bezpośrednim kierunkiem dr hab. Dagmary Jakimowicz. Zaplanowane badania poznawcze zostały przeprowadzone w ramach projektu badawczego POMOST, finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej. Praca doktorska została opracowana w postaci dobrze skonstruowanej monografii, w sposób przyjęty dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Kolejne rozdziały monografii obejmują zwarte *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, których treści stanowią bardzo dobre wprowadzenie czytelnika do tematu, założonych celów oraz uzyskanych najważniejszych wyników.

Cześć teoretyczna pracy (*Wstęp*, 45 stron) obejmuje dwa główne rozdziały, odpowiednio, *Struktura i organizacja chromosomu bakteryjnego w trakcie cyklu komórkowego* i *Organizacja chromosomu u Mycobacterium*, podzielone na logicznie uporządkowane podrozdziały. Ostatni podrozdział części teoretycznej pracy jest poświęcony współczesnej wiedzy na temat topoizomeraz kwasoopornych prątków *Mycobacterium smegmatis*, bakterii które jako dogodny model są często wykorzystywane w poznawczych badaniach prątków gruźlicy. W rozdziale pt. „*Rola Biologiczna topoizomeraz*” zabrakło mi natomiast danych na temat bardzo dobrze udokumentowanej roli biologicznej topoizomeraz, która polega na generowaniu poprzez lokalne wysokie superskręcenie DNA niezwykle, drugorzędowych struktur przestrzennych w obszarach różnych sekwencji powtórzonych. Struktury te, jak dowiedziono, stanowią „zawadę” przestrzenną dla widełek replikacyjnych. W obrębie takich sekwencji z dużą częstością pojawiają się więc pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA, indukujące mutagenne polimerazy IV i V, a w konsekwencji mutagenezę.

*Po przestudiowaniu całej części teoretycznej pracy mogę stwierdzić, po pierwsze, że zawarte w niej treści naukowe zostały ściśle podporządkowane tematowi pracy oraz sformułowanym celom, i po drugie, że zostały opracowane profesjonalnie, z bardzo dużym*



znawstwem, w oparciu o obficie cytowaną literaturę światową (ponad 200 pozycji, w tym 35 z ostatnich 5 lat).

Cel pracy doktorskiej mgr Patrycji Skut został umiejscowiony w jednym z ważnych, współczesnych kierunków poszukiwań naukowych w dziedzinie biologii infekcyjnej i mikrobiologii klinicznej, jakim jest poszukiwanie nowych celów (*tarcz*) molekularnych dla syntezy nowych, skutecznych leków przeciwbakteryjnych. Narastająca oporność na antybiotyki wielu groźnych dla ludzi i zwierząt szczepów i gatunków bakterii jest obecnie bardzo poważnym problemem współczesnej medycyny, a stąd zjawisko lekooporności stało się wyzwaniem dla podejmowania wielokierunkowych, molekularnych badań poznawczych patogennych bakterii, których celem jest identyfikacja nowych, molekularnych i bardzo specyficznych tarcz dla terapii zakażeń. Prątki gruźlicy stanowią obecnie szczególne zagrożenie ze względu, po pierwsze, na pojawienie się i rozpowszechnianie w świecie szczepów wielolekoopornych, a także ekstremalnie opornych na niemal wszystkie dostępne tuberkulostatyki, zaś po drugie ze względu na zdolność tych bakterii do unikania systemu odpornościowego gospodarza oraz na możliwość ich przetrwania w tkankach gospodarza w stanie uśpienia metabolicznego, w bardzo długich okresach czasu.

Topizomerazy, rodzina białek enzymatycznych uczestniczących niemal we wszystkich procesach komórkowych, niezbędnych dla procesów replikacji DNA, transkrypcji, segregacji chromosomów, podziałów komórkowych, a więc dla wzrostu i namnażania się komórek bakterii, stanowią obiekt dużego zainteresowania badaczy - jako potencjalne, specyficzne tarcze molekularne dla nowych antibakteryjnych leków. Stąd, sformułowaną przez Doktorantkę hipotezę, że topoizomeraza I (TopA), enzym niezbędny dla biologicznego życia bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, może być dobrym celem dla nowych tuberkulostatyków - można uznać za ciekawą uprawnioną. Zatem sformułowany cel pracy doktorskiej mgr Patrycji Skut: poznanie skutków zaburzeń poziomu TopA w komórkach *Mycobacterium smegmatis*, modelowego organizmu dla badań chorobotwórczych gatunków *Mycobacterium tuberculosis* i *Mycobacterium leprae*, uznają za interesujący z racji poznawczych, a także ważny z racji wyżej komentowanego problemu wielolekooporności prątków gruźlicy, a stąd konieczności poszukiwania nowych leków.

Cel główny Doktorantka realizowała w oparciu o skonstruowane, dobrze zaplanowane mutanty *M. smegmatis*, w których poziom ekspresji topoizomerazy TopA podlegał ścisłej, genetycznej regulacji „down and up”. Zatem w warunkach *in vivo* badano w modyfikowanych genetycznie szczepach, wobec kontroli jaką był dziki szczep *M. smegmatis*, wpływ zmian ilości i aktywności syntetyzowanego białka TopA na replikację i segregację chromosomu oraz na tempo wzrostu komórek. Podjęto również próbę wyjaśnienia roli biologicznej nietypowej domeny C-końcowej wciąż mało poznanej w warunkach *in vivo* enzymu TopA *Mycobacterium smegmatis*.

W obszernej, metodycznej części pracy doktorskiej mgr Patrycji Skut na 57 stronach monografii bardzo dokładnie, z dużą starannością przedstawiła w tabelach wszystkie użyte szczepy *E. coli* i *M. smegmatis*, mutanty i wektory, z podaniem źródeł ich pochodzenia. Zwraca uwagę fakt, że wszystkie zmodyfikowane szczepy *Mycobacterium smegmatis* zostały skonstruowane przez Doktorantkę w ramach realizacji celów pracy doktorskiej. Sposoby konstrukcji modelowych szczepów zostały przedstawione w postaci ładnych schematów, a prawidłowość ich konstrukcji została potwierdzona metodą analizy restrykcyjnej chromosomalnego DNA (*Southern blotting DNA*). Analiza tej części pracy dowodzi, że w badaniach wykorzystano bardzo nowoczesną aparaturę i programy komputerowe do analizy mikroskopowej komórek oraz ich wzrostu również w czasie



rzeczywistym. Zastosowano także bogaty warsztat biologii molekularnej do izolacji i oczyszczania białek oraz ich analizy *in vitro*. Nie mam wątpliwości, że mgr Patrycja Skut jest już doświadczonym eksperymentatorem; w realizację ambitnego celu swojej pracy doktorskiej „wprzęgła” zarówno bardzo nowoczesną, w tym unikatową w Polsce aparaturę, jak i bogaty, molekularny warsztat badawczy, który jest w pełni dostępny dla Doktorantów Zakładu Mikrobiologii Molekularnej, Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Wrocławskiego.

Starannie opracowany i logicznie uporządkowany rozdział *Wyniki* obejmuje 80 stron monografii oraz ponad 50 rysunków, tabel, schematów i zdjęć, dokumentujących krok po kroku wyniki uzyskane na kolejnych etapach badań. Po uważnym przestudiowaniu wszystkich wyników i załączonej dokumentacji chciałbym ocenić i skomentować zaledwie niektóre rezultaty, które w moim przekonaniu wnoszą nową wiedzę o roli biologicznej topoizomerazy *Mycobacterium smegmatis*.

I tak, za jeden z najważniejszych uznaję bardzo dobrze udokumentowany wynik dowodzący jednoznacznie, że topoizomeraza I *Mycobacterium smegmatis* jest niezbędna dla wzrostu i proliferacji bakterii. Delecja genu *topA* okazała się letalna dla komórek, co dowodzi, że inne topoizomerazy syntetyzowane przez *Mycobacterium smegmatis* (gyraza, topoizomeraza Ib oraz topo MN - unikalna topoizomeraza typu IV) - nie są w stanie komplementować u tego gatunku mykobakterii utraconej aktywności topoizomerazy I. Zatem topoizomeraza I *Mycobacterium smegmatis* może być rozważana jako potencjalna tarcza molekularna dla tuberkulostatyków. Dodatkowym uzasadnieniem tej sugestii mogą być, moim zdaniem, wyniki pracy doktorskiej dr Aleksandry Strzelczyk, wykonanej w Zakładzie Genetyki Drobnoustrojów UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Stączka, w której obowiązki recenzenta wypełniała dr hab. Dagmara Jakimowicz. Wyniki tej pracy dowodzą, że niektóre badane w tamtej pracy pochodne syntetycznych semikarbazydów bardzo silnie hamują wzrost zarówno *Mycobacterium smegmatis*, jak i *Mycobacterium tuberculosis*. Nie udało się jednak wyjaśnić mechanizmu ich antybakteryjnej aktywności. Zachodzi pytanie, czy badane semikarbazydy zaburzają funkcje/aktywność topoizomerazy I lub gyrazy, czy też działają na zupełnie inne cele i molekularne mechanizmy?

Doceniam interesujące wyniki o charakterze poznawczym uzyskane na modelu skonstruowanego, modyfikowanego szczepu PS02, noszącego kopię genu *topA* pod kontrolą regulowanego promotora *ptetRO*. Poziom transkryptu oraz białka *topA* bez induktora był ponad 50 % niższy niż w szczepie kontrolnym, zaś w obecności tetracykliny w stężeniu 3 ng i 10 ng/ml był, odpowiednio, 12 i 17 - wyższy. Badania kinetyki wzrostu wykazały, że 50 % zahamowanie syntezy topoizomerazy I spowalniało wzrost modyfikowanego szczepu w pożywce płynnej, szczególnie wyraźnie w czasie wzrostu w temp 42°C. Okazało się natomiast, co ciekawe, że bardzo duża nadprodukcja tego enzymu nie ma istotnego wpływu na tempo wzrostu komórek. Kolejne pytanie dotyczyło wpływu obniżonego poziomu *TopA* na lokalizację i liczbę w komórkach sergosomów i replisomów, a także na czas trwania poszczególnych faz cyklu komórkowego i morfologię komórek. Statystyczna analiza zdjęć ponad 1200 komórek skonstruowanego szczepu PS07, z obniżonym poziomem *TopA* do około 60% poziomu szczepu kontrolnego, pozwoliła Doktorantce sformułować wniosek, że deficyt topoizomerazy I w komórkach *M. smegmatis* prowadzi do zaburzeń, aczkolwiek niezbyt wielkich, w procesach replikacji DNA i segregacji chromosomów.

Mgr Patrycja Skut podjęła więc kolejną udaną próbę sprytnej konstrukcji szczepu PS16 o znacznie większej deplecji białka *TopA* - to jest do poziomu około 20 % szczepu dzikiego. Badania tego szczepu metodami hodowli na podłożach stałych i płynnych ujawniły zdecydowanie większe, bardzo wyraźne zahamowanie wzrostu (rys. 55 i 56), a badania



technikami mikroskopii fluorescencyjnej skupisk replisomu i sergosomu ujawniły w szczepie w taką dużą deplecją białka TopA znacznie wyraźniejsze zaburzenia w procesach replikacji DNA, segregacji chromosomu, cyklu komórkowego oraz w morfologii komórek. W podsumowaniu tej części pracy Doktorantka rekapituje na stronie 171 „morze” uzyskanych, wyników, skrupulatnie, a nawet drobiazgowo opisanych i udokumentowanych na 65 stronach stwierdzając cyt. „*W komórkach z deplecją TopA obserwuje się występowanie dłuższych komórek posiadających kilka sergosomów, oraz kilka replisomów, co oznacza zwiększoną częstość reinicjacji obecnych w komórce oriC, oraz zaburzenia czasu replikacji. Świadczy to o częstszym występowaniu komórek wykazujących poważne zaburzenia cyklu komórkowego*”. Zaś w jednym z końcowych wniosków dodaje cyt. „*Badania sugerują, że istnieje graniczny poziom TopA, poniżej którego wzrost badanego mikroorganizmu jest zahamowany, zwłaszcza w warunkach stresu temperaturowego.*”

W ostatniej części wyników mgr Patrycja Skut przedstawia wyniki dotyczące nieudanej próby konstrukcji szczepów zdolnych do ekspresji N - terminalnej oraz C-terminalnej domeny białka TopA *M. smegmatis*. Wydaje mi się, że w świetle wcześniejszych wyników niniejszej pracy, dowodzących niezbędności tego białka dla życia i wzrostu komórek, takie próby skazane były na niepowodzenie. Zaś udana konstrukcja domeny C-terminalnej w szczepie *M. smegmatis*, noszącym w chromosomie także natywną kopię genu topA pod kontrolą regulowanego tetracykliną promotora, nie wróżyła, moim zdaniem, uzyskania istotnych, klarownych wyników o roli biologicznej tej domeny w badaniach *in vivo* z racji bardzo złożonego układu biologicznego. Cel tego etapu pracy, ale do końca nie spełniony, zrozumiałem lepiej po przestudiowaniu Dyskusji, w której Doktorantka przedstawiła hipotezę o możliwej konkurencji sklonowanej części TopA z domeną białka natywnego lub jej oddziaływaniem z innymi białkami lub z DNA. Pomimo licznych prób, przy zastosowaniu bakteryjnego systemu dwuhybrydowego, zakładanych oddziaływań nie udało się jednak eksperymentalnie ujawnić. Natomiast obserwowane biologiczne efekty związane z nadprodukcją w komórkach tej domeny, podobne jak w przypadku dużej deplecji białka TopA, nie wykluczają takiej możliwości.

Bardzo wysoko oceniam świetnie napisaną *Dyskusję* ocenianej pracy doktorskiej. W tej ważnej części pracy doktorskiej mgr Patrycja Skut dowiodła, że zna dane najnowszej literatury przedmiotu i posiada rzetelną wiedzę na temat bardzo złożonych molekularnych mechanizmów dotyczących topologii i replikacji DNA, segregacji chromosomów bakteryjnych, podziałów komórkowych oraz mechanizmów ich regulacji. W sposób swobodny, z dużym znanstwem dyskutuje własne wyniki, konfrontując je umiejętnie z wynikami innych autorów. Szczególnie interesujące fragmenty *Dyskusji* dotyczą konfrontacji własnych wyników na temat roli biologicznej topizomerazy I *Mycobacterium smegmatis* z wynikami 5 prac doświadczalnych, opublikowanymi w latach 2013-2015 w znakomitych czasopismach przez konkurencyjny zespół Nagaraja i wsp. na temat biochemii i biologii topizomerazy I *Mycobacterium smegmatis* i *Mycobacterium tuberculosis*.

*W zakończeniu pragnę stwierdzić, że trzy ostrożnie wnioski końcowe, sformułowane na stronie 203, są uprawnione w świetle bardzo dobrze udokumentowanych wyników, uzyskanych przy pomocy specjalistycznej aparatury oraz nowoczesnych technik i metod molekularnych. Mgr Patrycji Skut udało się na poziomie pojedynczych komórek w heterogennej populacji *Mycobacterium smegmatis* bardzo precyzyjnie wykazać, że zaburzenia topologii DNA w wyniku obniżenia poziomu lub aktywności topizomerazy I prowadzą do zaburzeń replikacji chromosomów, polegających przede wszystkim na reinicjacji replikacji oraz na zaburzeniach czasu trwania poszczególnych faz cyklu komórkowego i*



nierównocennego podziału komórkowego. Zatem, można postawić ostrożny wniosek, że cała topizomeraza I lub konserwatywna C-termonalna domena tego białka mogą być potencjalnymi celami dla syntezy nowych skutecznych tuberkulostatyków.

### **Wnioski końcowe**

***W oparciu o dokonaną analizę treści naukowych pracy doktorskiej mgr Patrycji Skut, opracowanej w postaci autorskiej monografii, a także na podstawie własnej wiedzy na temat kierunków poszukiwań naukowych w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki bakterii, realizowanych bardzo konsekwentnie od lat w Katedrze Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego stwierdzam, że - oceniana praca doktorska spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Skut do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.***

*Nie wnoszę jednak o stosowne wyróżnienie tej ambitnej i bardzo dobrze zrealizowanej pracy doktorskiej, bowiem opisane w monografii wyniki nie zostały dotychczas opublikowane. Spis załączonego do monografii doktorskiej dorobku naukowego mgr Patrycji Skut obejmuje, co prawda, współautorstwo 2 prac doświadczalnych oraz 1 pracy przeglądowej, jednak ich tematyka nie jest bezpośrednio związana z tematem i celami Jej pracy doktorskiej.*

