



UNIWERSYTET GDAŃSKI



80-822 Gdańsk, ul. Kładki 24; tel.: +48 58 5236320, +48 58 5236321; fax: +48 58 5236430  
www.biotech.ug.edu.pl



## Intercollegiate Faculty of Biotechnology

Prof. dr hab. IGOR KONIECZNY  
Head of Laboratory of Molecular Biology  
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, Poland  
e-mail: igor.konieczny@biotech.ug.edu.pl  
tel.: +48 58 523 63 65  
faks: +48 58 523 64 27

23.10.2017

### Rada Naukowa Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Strzałki pod tytułem: „Rola topoizomerazy I w organizacji chromosomów *Streptomyces coelicolor* oraz wpływu domeny C-końcowej na aktywność enzymu”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Agnieszki Strzałki dotyczy analizy dynamiki chromosomalnego DNA *Streptomyces coelicolor* oraz analizy aktywności topoizomerazy TapA w procesie segregacji materiału genetycznego. Praca została wykonana w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej a promotorem pracy jest Pani dr hab. Dagmara Jakimowicz.

Segregacja chromosomów jest jednym z kluczowych procesów pozwalających na prawidłowe dziedziczenie przez komórki potomne materiału genetycznego. Mechanizmy molekularne związane z dynamiką chromosomalnego DNA nie zostały ciągle do końca poznane. Trudnością w badaniu tego procesu jest występowanie wielu czynników, które wpływają na segregację chromosomalnego DNA. W bakteriiach zidentyfikowano szereg takich czynników w tym topoizomerazy, które wpływają na superskrętność DNA chromosomów bakteryjnych. Badanie procesu segregacji chromosomów jak i badania topoizomeraz jest ważne w szczególności w kontekście rosnącego zagrożenia związanego z rozprzestrzenianiem się w mikroorganizmach oporności na antybiotyki. Wykorzystanie do badań modelu *Streptomyces* jest zasadne z uwagi na ciekawą biologię tego gatunku, ale również z uwagi na produkcję metabolitów wtórnych o własnościach antybakteryjnych i antygrzybiczych. Uważam, że podjęcie tematu rozprawy i realizacja opisanych celów były jak najbardziej zasadne.

Rozprawa doktorska Pani mgr Strzałki ma klasyczną organizację to znaczy zawiera rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia, Wykaz skrótów i rozdział Załączniki w którym znalazło się porównanie sekwencji aminokwasowej homologów TopA. Całość poprzedza dobrze napisane w języku polskim i języku angielskim streszczenie pracy. Należy podkreślić, że cała praca została napisana bardzo dobrze pod względem językowym. Poza nielicznymi drobnymi potknięciami jest bardzo mało błędów i pracę bardzo dobrze się czyta.

Autorka w umiejętny sposób, dobrym językiem naukowym i poprawną składnią prowadzi czytelnika w lekturze trudnego merytorycznie tekstu. Jako nieliczne potknięcia należy wymienić stosowanie skrótów rpm zamiast obr/min, nie najzręczniejsze użycie słowa „namnażanie” w kontekście reakcji PCR, używanie słowa „ilość” w kontekście liczby cząsteczek czy policzalnej liczby usuwanych superskrętów, słowa „wyższy” w kontekście czasu reakcji czy stosowanie nieprawidłowej odmiany rodzajowej „DNA”. To małe błędy, których trudno się całkowicie ustrzec pisząc teksty naukowe w języku polskim. Nie obniżają one wartości pracy. Tak chwałę pracę za dobry styl należy również docenić dbałość o stronę graficzną. Ryciny zostały przedstawione w bardzo czytelny sposób. Jedyne zastrzeżenie to niektóre opisy/legendy rycin umieszczono na kolejnej stronie tekstu co utrudniało lekturę. W tekście znajdują się też niepotrzebne przerwy edycyjne. Wydaje się też, że wprowadzenie akapitów w spisie bibliografii utrudnia znalezienie nazwiska pierwszego autora publikacji. Są to jednak szczegóły, które nie wpływają na ocenę pracy. Jeszcze raz podkreślam, że praca pod względem edytorskim została przygotowana bardzo starannie.

Wstęp bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie a przytaczana literatura obejmuje zarówno starsze prace jak i te opublikowane w ostatnim czasie. Cel pracy został dobrze zdefiniowany. Przedstawiono również dwa kluczowe pytania na które autorka z powodzeniem przedstawia odpowiedzi w rozdziałach Wyniki i Dyskusja. Rozdział Materiały i metody zawiera dokładne opisy stosowanych metod badawczych. Pewien niedosyt pozostawia opis eksperymentów z zastosowaniem pułapki magnetycznej dla oznaczania procesywności topoizomerazy. Nie znajduję informacji czy i jeśli tak to w jaki sposób kontrolowano liczbę cząsteczek topoizomerazy związanych z DNA? Bardzo proszę o wyjaśnienie. W rozdziale materiały i wyniki znalazły się bardzo dobre i ułatwiające lekturę schematy konstrukcji szczepów. Obok nich znajdują się też wyniki weryfikacji uzyskanych klonów oraz analiza poziomu/ilości białka TopA i jego wariantów w skonstruowanych szczepach. Uważam, że te ostatnie dane można by już zaliczyć jako wyniki i mogły by znaleźć się wraz ze szczegółową analizą i opisem w rozdziale Wyniki lub Załącznikach. Analiza eksperymentów typu Western nie została w odróżnieniu od innych danych eksperymentalnych przedstawionych z dużą szczegółowością. Z przyjemnością analizuje się wyniki eksperymentów przedstawionych w dalszej części pracy. To eksperymenty przeprowadzone i opisane z wielką starannością i jakością. Przeprowadzona analiza statystyczna jest na wysokim poziomie i pozwala sądzić o dużej biegłości autorki pracy w jej stosowaniu. Ryciny zawierają zdjęcia po klatkowe żywych komórek z widocznymi sygnałami fluorescencyjnymi czynników dla analizy dynamiki chromosomalnego DNA. To bardzo trudne do przeprowadzenia eksperymenty wymagające dużych umiejętności i doświadczenia. Należy je ocenić bardzo wysoko. Na niektórych rycinach słabo widoczny jest sygnał DIC (kanał szary) (np. Rysunek 5.3). Czy nie utrudniało to przeprowadzenie pomiarów? To jedyna uwaga co do jakości technicznej przeprowadzonych doświadczeń. Eksperymenty w tej pierwszej części rozdziału Wyniki dotyczą badań *in vivo*

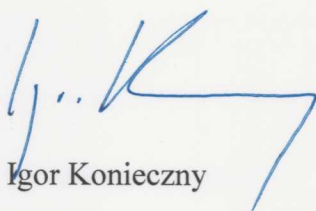
dynamiki chromosomów *Streptomyces*. Skonstruowanie odpowiednich szczepów z obniżonym i podwyższonym poziomem TopA, oraz analiza pozycji *origin* replikacji, pozycji polimerazy DNA, i chromosomalnego DNA pozwoliły na określenie efektów fenotypowych *topA*. Autorka wykazała, że odpowiedni poziom TopA jest niezbędny dla zdolności spor do kiełkowania, prawidłowego wzrostu grzybni wegetatywnej jak również do prawidłowego rozdziału chromosomów w strzępkach i pozwala na utrzymanie stałej odległości pierwszego chromosomu względem wierzchołka strzępki. Eksperymenty zostały zaplanowane i przeprowadzone z najwyższą jakością.

Druga część rozdziału Wyniki dotyczy głównie analizy biochemicznej TopA. Oczyszczenie wariantów delecyjnych białka i przeprowadzenie eksperymentów analizujących kinetykę enzymu doprowadziły do określenia roli domeny C-końcowej białka w wiązaniu DNA. Autorka wykazała, że powtarzalne motywy lizynowe odpowiadają za niespecyficzne wiązanie DNA i stabilizują kompleks nukleoproteinowy. Szczególnie interesujące wydają się eksperymenty nad procesywnością TopA a w szczególności eksperymenty z pułapką magnetyczną podczas których autorka analizowała czas opóźnienia reakcji, liczbę kroków reakcji i liczbę usuwanych superskrętów. Czy eksperymenty z użyciem pułapki magnetycznej wymagały standaryzacji liczby cząsteczek TopA? Również i w tej części pracy badania były bardzo dobrze zaplanowane i wykonane.

W rozdziale Dyskusja autorka omawia otrzymane wyniki w kontekście poprzednich prac zespołu oraz wyników uzyskanych w innych ośrodkach. Dyskusja jest przeprowadzona bardzo merytorycznie. W rozdziale znalazł się też wyśmienity schemat ilustrujący w bardzo czytelny sposób wyniki uzyskane w pracy i na podstawie tych wyników znaczenie TopA w rozwoju *S. coelicolor*. To bardzo dobre podsumowanie rozprawy.

W podsumowaniu recenzji pragnę stwierdzić, że przedstawiona praca Pani mgr Agnieszki Strzałki spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Strzałki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na uzyskanie przez autorkę wyśmienitych wyników istotnych dla dyscypliny naukowej, znajdujących uznanie międzynarodowe wniosuję do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Strzałki.



Igor Konieczny