



Prof. dr hab. Agnieszka Szalewska-Palasz  
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii  
Uniwersytet Gdański  
ul. Wita Stwosza 59  
80-308 Gdańsk  
email: Agnieszka.Szalewska-Palasz@ug.edu.pl  
tel: (+48) 58 523 6026

Gdańsk, 24.09.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pani magister Małgorzaty Płachetki  
„Mechanizm inicjacji replikacji chromosomu *Streptomyces*”**

Powielanie materiału genetycznego nie przestaje być fascynującym przedmiotem badań, mimo wielu dotychczasowych odkryć. Szczególnie replikacja DNA organizmów prokariotycznych służy jako model badawczy dla zrozumienia skomplikowanych procesów z nią związanych i ją regulujących. Poza typowymi przedstawicielami bakterii modelowych Gram-ujemnych jak *Escherichia coli* czy Gram-dodatnich jak *Bacillus subtilis*, gatunki o bardziej złożonych cyklach rozwojowych są bardzo interesującym obiektem badań. Do takich organizmów należą bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Te Gram-dodatnie bakterie należące do rzędu promieniowców charakteryzują się kilkoma etapami rozwoju, podczas którego tworzą zróżnicowaną grzybnię oraz egzospory. W jednym ze stadiów rozwojowych tych mikroorganizmów występuje postać grzybni wegetatywnej zawierającej wiele kopii chromosomalnego DNA, replikującego się w sposób niezynchronizowany. Dlatego też poznanie mechanizmów replikacji, a szczególnie inicjacji tego procesu u *Streptomyces* jest bardzo ważne dla zrozumienia skomplikowanych procesów regulacyjnych zachodzących w tych bakteriach. Tę problematykę podjęła w swojej rozprawie doktorskiej Pani mgr Małgorzata Płachetka. Przedstawiona do oceny rozprawa wykonana została w Zakładzie Mikrobiologii Molekularnej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, pod opieką promotora Pani prof. dr hab. Jolanty Zakrzewskiej-Czerwińskiej i promotora pomocniczego dr Marcina Wolańskiego. Zespół Pani prof. Zakrzewskiej-Czerwińskiej od lat jest w światowej czołówce

badaczy mechanizmów replikacji DNA, dzięki czemu badania prowadzone przez Doktorantkę i przedstawione w rozprawie doktorskiej są na bardzo wysokim poziomie naukowym.

Rozprawa doktorska ma postać trzech wieloautorskich publikacji, dwóch oryginalnych i jednej przeglądowej. We wszystkich Doktorantka jest pierwszym autorem (w pracy przeglądowej autorem równorzędnym). Publikacje eksperymentalne ukazały się w renomowanych czasopismach międzynarodowych o szerokim zasięgu: *Microbiology Spectrum* i *Microbiology*, zaś praca przeglądowa w polskim czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. Prace w rozprawie zostały poprzedzone streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz zwięzłym omówieniem uzyskanych wyników. Przedstawienie rozprawy doktorskiej w postaci zbioru publikacji poświęconego jednej linii tematycznej jest zgodne z wymogami zawartymi w ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki. Stanowi ona, iż rozprawa doktorska może stanowić wyodrębnioną część prac zbiorowych pod warunkiem wykazania odpowiedniego wkładu kandydata w powstanie prac, zarówno w części koncepcyjnej, jak i uzyskania wyników, ich przedstawienia i dyskusji. Pozycja pierwszego autora we wszystkich publikacjach, jak i oświadczenia przedstawiające procentowy wkład poszczególnych współautorów (oraz *Authors Contribution* w publikacji w *Microbiology Spectrum*) nie pozostawiają wątpliwości, iż udział Doktorantki w powstanie tych publikacji był kluczowy. W związku z tym mogę stwierdzić, iż wymóg formalny względem tej postaci rozprawy został spełniony.

Celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Płachetki było zbadanie mechanizmów leżących u podstaw regulacji inicjacji replikacji bakterii z rodzaju *Streptomyces*. W pierwszej publikacji (*Microbiology* 2019) przedstawiona została szczegółowa analiza rejonu rozpoczynającego replikację DNA u *Streptomyces* czyli *origin* replikacji. Jest to interesujący model, gdyż dotychczas mimo identyfikacji mechanizmu inicjacji replikacji przez białko DnaA nie opisano jeszcze mechanizmów umożliwiających specyficzne rozplecenie DNA rozpoczynające proces tworzenia widełek replikacyjnych. W pracy zastosowane zostały dwie metody footprintingu – z użyciem DMS i DNazyI. Dzięki czemu można było zidentyfikować różne rodzaje interakcji między DNA i białkiem DnaA. Tymi metodami wyznaczono 14 kaset pozwalających na wiązanie białka DnaA w rejonie *oriC* *S. coelicolor*, oraz określono z użyciem metod bioinformatycznych sekwencję konsensusową tej kasety. Co ciekawe, różni się ona od znanej do tej pory sekwencji DnaA-boxu bakterii modelowej *E. coli*. Bardzo interesujące badania weryfikujące uzyskane modelowaniem komputerowym sekwencje potencjalnego rozplatania DNA przez białko DnaA zostały wykonane przy pomocy nukleazy P1 i



doświadczenia typu primer extension. Jednocześnie, mapowanie punktu inicjacji replikacji (RIP) *in vivo* przeprowadzone na modelu *S. venezuelae* pozwoliło na potwierdzenie jednego z dwóch określonych *in vitro* miejsc funkcjonalnego rozplatania DNA. Obserwacje te są cennym wkładem w poznanie mechanizmów replikacji DNA u *Streptomyces*. W drugiej publikacji (Microbiol. Spectr. 2021), głównym pytaniem badawczym była rola białka AdpA w regulacji replikacji i różnicowania *Streptomyces*. Modelem badawczym zastosowanym w tej pracy był przedstawiciel tego rodzaju, *S. venezuelae*. Dotychczasowe badania na modelu *S. coelicolor* i *S. griseus* wskazywały na rolę AdpA jako regulatora ekspresji genów na poziomie transkrypcji, szczególnie tych związanych ze zmianami morfologii bakterii i produkcją metabolitów wtórnych. U *S. venezuelae* zaobserwowano, iż brak funkcjonalnego AdpA upośledzał różnicowanie się bakterii w czasie rozwoju grzybni. Interesująco, białko AdpA jest w stanie pozytywnie kontrolować ekspresję swojego własnego genu, dzięki oddziaływaniu z rejonem promotorowym, co potwierdzono zarówno *in vivo* jak *in vitro*. Komórkowy poziom tego białka zmieniał się także w zależności od fazy wzrostu bakterii. Jednakże nie zaobserwowano wiązania AdpA do rejonu *oriC*, w przeciwieństwie do sytuacji obecnej w *S. coelicolor*, gdzie AdpA hamowało inicjację replikacji. Co ciekawe, u *S. venezuelae* białko AdpA jest niezbędne do produkcji chloramfenikolu. Badania przedstawione w tej pracy są ważnym wkładem w zrozumienie roli i działania plejotropowego białka AdpA u *Streptomyces*. Trzecia z prac, publikacja przeglądowa (Postępy Hig Med Dośw 2017), wpisuje się w cały kontekst badań Doktorantki, przedstawiając bardzo ciekawie stosowane obecnie metody badań oddziaływania między białkami a DNA i znaczenia tych metod w poznawaniu struktury chromosomów bakteryjnych. Jest to interesujące opracowanie, które może stanowić zarówno przydatny materiał dla studentów i doktorantów, jak i wstęp metodologiczny do rozprawy (wiele z opisanych metod zostało zastosowane w pracach eksperymentalnych). Dlatego podkreślić należy znaczenie i wartość pracy przeglądowej (szczególnie jedynie dwuautorskiej) w dorobku Doktorantki. Może nawet z pożytkiem dla rozprawy byłoby umieszczenie tej pracy przeglądowej jako pierwszej, a nie ostatniej w zestawie publikacji.

Chciałabym poprosić Doktorantkę o odpowiedź na następujące pytanie, jakie nasunęły się mi podczas recenzowania pracy:

- Wiele badań nad replikacją DNA zostało dotychczas wykonane na modelu *S. coelicolor*. Jakie były zatem powody wyboru modelu badawczego w postaci *S. venezuelae* i jakie ma on zalety w porównaniu z poprzednim modelem?

- Jaki jest poziom konserwowania ewolucyjnego oraz funkcjonalnego genu i białka AdpA u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich?
- Czy u *Streptomyces* odpowiedź ścisła i jej alarmon ppGpp bierze udział w regulacji ekspresji genu *dnaA* oraz w aktywacji transkrypcyjnej *origin* replikacji?
- Jaka może być korzyść ewolucyjna obecności wielu miejsc wiązania DnaA w *oriC Streptomyces* i czy ma to związek z cyklem życiowym tej bakterii?

W podsumowaniu, mogę stwierdzić, iż prezentowana rozprawa stanowi spójny zestaw badań o dużych walorach poznawczych. Oceniam bardzo wysoko zawarte w publikacjach wyniki badań, szczególnie że zostały uzyskane z zastosowaniem szeregu metod zarówno klasycznej mikrobiologii, jak i zaawansowanych biologii molekularnej. Ich opublikowanie oczywiście świadczy też o uznaniu tych wyników przez -jak wiemy- oceniających bardzo krytycznie recenzentów czasopism, ponadto ważne jest także to, że w postaci publikacji wyniki te zostały już przedstawione szerszemu gronu naukowców.

We wniosku końcowym, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Płachetki jest znaczącym osiągnięciem naukowym, wnoszącym istotne nowe informacje na temat mechanizmów inicjacji replikacji DNA u organizmów prokariotycznych, szczególnie dla mikroorganizmu o nietypowym cyklu rozwojowym, jakim jest *Streptomyces*. Rozprawa przedstawiona do recenzji stanowi zestaw oryginalnych badań naukowych, spełniając jednocześnie wymogi formalne zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), w zw. Z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późniejszymi zmianami). Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Płachetki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysokie walory naukowe pracy, wnoszę o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.

A. Szalewska - Peten