



Warszawa, 11.05.2018

Dr hab. Łukasz Dziewit
Zakład Genetyki Bakterii
Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. KAMILA MICHAŁA ŻEBRACKIEGO pt. „Rola białek RepA w regulacji ekspresji kaset *repABC* oraz aktywnej segregacji megaplazmidów *Rhizobium leguminosarum*”

Rozprawa doktorska Pana Kamila Michała Żebrackiego wykonana pod kierunkiem dr. hab. Andrzeja Mazura, prof. UMCS w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie została przygotowana zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w publikacji, która ukazała się w piśmie *PLoS ONE* (Żebracki i wsp. *PLoS ONE*, 2015; IF₂₀₁₅ 3,057; punkty MNiSW 35). Warto nadmienić, że mgr Żebracki jest dodatkowo współautorem 6 innych prac eksperymentalnych oraz 3 prac przeglądowych. W sumie jest więc on współautorem 10 publikacji o sumarycznym współczynniku IF około 28. Publikacje te ukazały się w latach 2014-2018. Według mnie jest to duże osiągnięcie, zasługujące na pochwałę.

OCENA PRACY

Przedstawiona do oceny rozprawa została napisana w języku polskim i ma układ typowy dla większości prac dyplomowych, choć zastanawia mnie umieszczenie rozdziału „Streszczenie” na końcu pracy. Rozprawa doktorska liczy 129 stron i zawiera 20 ilustracji oraz 11 tabel. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i językowym, a moje uwagi w tym zakresie są znikome i zostały zamieszczone poniżej.

Tytuł pracy „Rola białek RepA w regulacji ekspresji kaset *repABC* oraz aktywnej segregacji megaplazmidów *Rhizobium leguminosarum*” jest sformułowany w sposób poprawny i dobrze odpowiada treści pracy.

Wstęp pracy liczy 34 strony i składa się z 5 rozdziałów. Jest on wg mnie doskonale napisany i bardzo dobrze wprowadza w tematykę pracy doktorskiej przedstawiając kolejno zagadnienia związane z: (i) organizacją strukturalną genomów bakteryjnych, (ii) symbiozą rizobiów z roślinami, (iii) strukturą genomów rizobiów, (iv) mechanizmami stabilizującymi replikony pozachromosomowe rizobiów oraz (v) charakterystyką plazmidów typu *repABC R. leguminosarum* bv. trifolii TA1. Uważam za właściwe, iż Doktorant szczególnie dużo uwagi

poświęcił we Wstępie na przedstawienie mechanizmu działania i regulacji transkrypcji modułów *repABC*, co jest kluczowe dla właściwego zrozumienia otrzymanych przez niego wyników.

Kolejny rozdział – Materiały i metody – jest napisany w sposób bardzo szczegółowy, ale jednocześnie zrozumiały. Czytając ten rozdział zwróciłem uwagę na ogrom pracy włożonej przez mgr. Żebrackiego w wykonanie badań. Stworzył on aż 53 nowe konstrukty plazmidowe i zastosował podczas wykonywania pracy 25 (nie licząc wielu modyfikacji) różnych technik badawczych i analitycznych. Jednoznacznie świadczy to o jego pracowitości i biegłości w pracy laboratoryjnej.

Cel naukowy pracy doktorskiej został sformułowany w sposób jednoznaczny. Jest nim „(...) scharakteryzowanie białek RepA (białka typu NTPazy) kodowanych w kasetach *repABC* plazmidów *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii TA1 (RtTA1) oraz zbadanie ich roli w regulacji ekspresji genów *repABC* i aktywnej segregacji wszystkich czterech replikonów pozachromosomowych tego szczepu.” Już sam Cel od razu wskazuje na pewną dychotomię pracy, co widać też w kolejnej części opisującej wyniki, gdyż Doktorant przeprowadził: (i) analizę regulacji transkrypcji genów *repABC* plazmidów szczepu TA1 oraz (ii) molekularną charakterystykę białek RepA tych plazmidów.

Rozdział Wyniki jest napisany w sposób przejrzysty i zrozumiały. Jak zauważono wcześniej składa się on z dwóch części, które tworzą jednak powiązaną całość i wzajemnie się dopełniają. Rozdział ten ma strukturę analogiczną do zaprezentowanej w publikacji, która ukazała się w piśmie *PLoS ONE* i której Doktorant jest pierwszym Autorem. W obu opracowaniach wykorzystano też te same ilustracje. Wg mnie duża szczegółowość, kompaktowość i przejrzystość przygotowanych rycin zasługuje na pochwałę.

Rozdział Dyskusja jest napisany w bardzo dobrym stylu. Doktorant pokazał w nim, że posiada szeroką wiedzę w zakresie prowadzonych badań. W sposób ciekawy interpretuje on uzyskane wyniki badań w świetle danych literaturowych. Robi to w sposób bardzo rzetelny, przyznając, że niektóre z uzyskanych przez niego wyników stanowią jedynie potwierdzenie wcześniejszych badań przeprowadzonych przez innych naukowców. Jednocześnie, w rozdziale tym wskazano szczególnie nowatorskie odkrycia – np. udowodnienie specyficzności oddziaływań białek RepA z operatorami jedynie rodzicielskich modułów *repABC* w układzie wieloreplikonowym. W rozdziale Dyskusja znalazła się też informacja na temat możliwości wykorzystania zgodnych systemów *repABC* do konstrukcji nowych wektorów do badań wymagających układów wieloplazmidowych. Osobiście żałuję, że Doktorant nie podjął próby konstrukcji takich wektorów co stanowiłoby element aplikacyjny niniejszej rozprawy, tym bardziej, że wskazana przez Doktoranta dyscyplina to Biotechnologia, a niestety tej biotechnologii brakuje w niniejszym opracowaniu.

NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE

W moim mniemaniu najważniejsze osiągnięcia naukowe zaprezentowane w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej to:

- (i) wykazanie, że kasety *repABC* analizowanych plazmidów *R. leguminosarum* TA1 stanowią operony z jednym aktywnym promotorem zlokalizowanym powyżej genu *repA*;
- (ii) wykazanie, że białko RepA jest niezbędne dla autorepresji, ale silne hamowanie transkrypcji poszczególnych operonów *repABC* jest możliwa tylko w obecności obydwu białek, tj. RepA i RepB, natomiast nie jest do tego konieczna sekwencja *parS*;

(iii) wykazanie specyficzności wiązania się RepA wyłącznie do operatorów pochodzących z plazmidów rodzicielskich;

(iv) wykazanie, że specyficzność oddziaływania białka RepA z operatorem zależy od obecności ADP/ATP;

(v) wykazanie, że białka RepA plazmidów RtTA1, dzięki obecności N-końcowej domeny dimeryzacyjnej, tworzą stabilne homooligomery, a proces oligomeryzacji jest zależny od ATP;

(vi) wykazanie że oligomeryzacja białek RepA jest niezbędna do ich związania z operatorami kaset *repABC* oraz do partycji plazmidów.

Podsumowując, w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej udowodniono podwójną rolę białek RepA kodowanych w modułach *repABC* plazmidów RtTA1, wskazując na ich udział zarówno w procesie aktywnej segregacji, jak i w negatywnej autoregulacji ekspresji operonów *repABC*. Ponadto wykazano, że białka RepA są jednym z kluczowych elementów zapewniających zgodne współwystępowanie kilku replikonów wyposażonych w bardzo podobne systemy replikacyjne/partycyjne w jednej komórce bakteryjnej.

KOMENTARZE, PYTANIA I ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Po przeczytaniu przedstawionej mi do recenzji pracy nasunęły mi się następujące komentarze/pytania/zagadnienia do dyskusji, proszę więc Doktoranta o ustosunkowanie się do nich:

1. Czy podjęto próbę eksperymentalnego wyznaczenia miejsc startu transkrypcji w kasetach *repABC* analizowanych plazmidów?

2. Ile wykonano powtórzeń eksperymentu badającego schemat oligomeryzacji białek RepA w czasie opisanego na stronie 90 rozprawy?

3. Na jakiej podstawie wybrano plazmid pRleTA1b do analizy interakcji białek RepA-RepA oraz RepA-RepB *in vivo* z zastosowaniem bakteryjnego systemu dwuhybrydowego? Dlaczego właśnie ten plazmid?

4. Jakie jest podobieństwo sekwencji aminokwasowych białek RepA operonów *repABC* plazmidów RtTA1 i plazmidów innych *Rhizobium* spp. lub innych *Alphaproteobacteria*? Czy podjęto próbę analizy filogenetycznej białek RepA plazmidów typu *repABC Rhizobium* spp.?

Dodatkowo, z obowiązku recenzenta przedstawiam też swoje niewielkie uwagi co do strony edytorskiej pracy. Niniejsze uwagi mają jedynie charakter informacyjny i nie wymagają komentarza Doktoranta.

1. RNA i DNA to rodzaj męski, bo to kwas nukleinowy – więc nie „plazmidowe DNA” tylko „plazmidowy DNA” itd.

2. Myślę, że w języku polskim lepszym i bardziej precyzyjnym określeniem genomów złożonych z wielu replikonów jest „genom wieloreplikonowy” niż „wieloczęściowy”.

3. W wykazie zastosowanych materiałów (str. 40-42) tylko dla części związków chemicznych podano wzory. Należałoby konsekwentnie podać wzory dla wszystkich związków, lub po prostu wcale tego nie robić.

4. Biowar nie stanowi jednostki taksonomicznej bakterii, dlatego też jego nazwa (np. bv. trifolii) nie powinna być pisana kursywą.

5. Tabela nr 3. Zakładam, że „Am^r” miało oznaczać oporność na ampicylinę, a więc powinno być „Ap^r”.

6. Strona 79, podpis pod rysunkiem nr 10. Moim zdaniem nie powinniśmy mówić/pisać „konserwatywnych domen białkowych”, a „konserwowanych domen białkowych”.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stanowi też dowód szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia przez niego prac naukowych w zakresie mikrobiologii, biotechnologii i biologii molekularnej bakterii. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr. Kamila Michała Żebrackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, udokumentowany ogromny wkład Doktoranta w przeprowadzone badania oraz fakt, że wyniki zostały już opublikowane w oryginalnym artykule naukowym wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej mgr. Kamila Michała Żebrackiego stosowną nagrodą.

Dr hab. Łukasz Dziewit