



SPÓŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

Prof. zw. dr hab. Adam Jaworski

Łódź, 08. 05. 2018

Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie

Spółeczna Akademia Nauk w Łodzi

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

tel. komórkowy: 607-356-577

e-mail: adam@biol.uni.lodz.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Kamila Żebrackiego zatytułowanej „Rola białek RepA w regulacji ekspresji kaset repABC oraz aktywnej segregacji megaplazmidów *Rhizobium leguminosarum*”.

1. Formalna ocena pracy.

Praca doktorska mgr Kamila Żebrackiego została w całości zrealizowana w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Andrzeja Mazura. Nie odnalazłem informacji - kto wypełniał obowiązki promotora pomocniczego, o ile taki promotor pomocniczy został powołany? Nie odnalazłem także informacji o źródłach finansowania bardzo kosztownych badań genetycznych i molekularnych, precyzyjnie przedstawionych na stronie cele 68 - w sformułowanym, kierunkowym celu pracy, dwóch głównych celach etapowych, na które składają się, odpowiednio, trzy i cztery cele szczegółowe. Stwierdzam, że podjęte przez Doktoranta badania poznawcze dotyczące roli białek RepA w replikacji kaset *repABC* oraz segregacji megaplazmidów *Rhizobium leguminosarum* zostały bardzo dobrze przemyślane oraz starannie i logicznie zaplanowane. Natomiast z pewnym zdziwieniem odkryłem w monografii doktorskiej, że obszerny rozdział II zatytułowany *Materiały i Metody* (strony 40-67) poprzedza rozdział III *Cel pracy* (strona 68). Moim zdaniem, sformułowany temat każdego projektu badawczego (w tym przypadku temat pracy doktorskiej) niejako dyktuje nakreślenie celu/celów badawczych, które pragniemy zrealizować, jednak ich pomyślna realizacja jest uzależniona od właściwie dobranych technik, metod badawczych i nowoczesnych urządzeń, które pozwolą na uzyskanie wiarygodnych wyników. Wyrażam pogląd, że nawet najlepsze metody oraz nowoczesne techniki i urządzenia nie mogą „dyktować” kierunków i celów badań poznawczych, mogą oczywiście takie badania bardzo wspomagać, przyspieszać i pogłębiać. Żadna technika, metoda, nawet najlepsza, nie zastąpi przecież rozumu, inwencji, kreatywności badacza, naukowca, uczonego.

Zatem z naukowej ciekawości stawiam w tym miejscu pytanie do mgr Kamila Żebrackiego, czy podziela mój pogląd w powyższej sprawie, czy może ma ugruntowaną, odmienną opinię na ten temat?

Rozprawa doktorska mgr Kamila Żebrackiego ma postać starannie opracowanej monografii, na którą składają się: obszerna część teoretyczna (*Wstęp*), wyżej komentowany *Cel* pracy, wystarczająco dokładnie opisana część metodyczna (*Materiały i Metody*), skrupulatnie, krok po kroku, przedstawione i opisane rezultaty (*Wyniki*), zwięzła, dobrze napisana *Dyskusja* oraz spis cytowanych pozycji piśmiennictwa naukowego (*Literatura*), obejmujący aż 213 prac i artykułów, w większości z lat 2000-2017. Monografię uzupełniają zwarte, dwustronicowe *Streszczenia* napisane w języku polskim i angielskim.

Za bardzo dobry pomysł uznaję zamieszczenie na końcu monografii spisu **10** prac naukowych (7 prac doświadczalnych i 3 artykułów przeglądowych), opublikowanych w latach 2014-2018, to jest w czasie Jego Studiów Doktoranckich. W jednej z tych prac (*PLoS One*, 2015) jest On pierwszym autorem, w pozostałych **9** jednym z 4-5 współautorów.

Jako doświadczony nauczyciel akademicki i wychowawca licznej kadry naukowej doktorów i doktorów habilitowanych pragnę podkreślić w tym miejscu, że mgr Kamil Żebracki bardzo dobrze spożytkował czas swoich Studiów doktoranckich na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie. Nie tylko realizował program Studiów doktoranckich i cele swojej ambitnej pracy doktorskiej, ale także aktywnie, z dużym publikacyjnym pożytkiem własnym, uczestniczył w realizacji innych projektów badawczych prowadzonych w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS.

2. Ocena merytoryczna pracy

Treści obszernej, teoretycznej części monografii doktorskiej zostały podporządkowane tematowi i nakreślonemu celowi pracy. W pięciu logicznie uporządkowanych podrozdziałach mgr Kamil Żebracki przedstawił dane literatury światowej na temat organizacji wieloczęściowych genomów bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem genomów rizobiów, stabilności w komórkach tych bakterii pozachromosomalnych replikonów, to jest plazmidów, modułu replikacyjnego i modułu partycyjnego genów kaset repABC. Ze szczególnie dużym zainteresowaniem przeczytałem podrozdziały dotyczące: molekularnych mechanizmów segregacji plazmidów i roli białek RepA i RepB w partycji replikonów ABC oraz w regulacji procesu transkrypcji kaset genów repABC. W ostatnim podrozdziale *Wstępu* Doktorant szczegółowo scharakteryzował plazmidy TA1 i RtTA1 modelowego szczepu *Rizobium leguminosarum*, które były obiektem Jego zaawansowanych badań poznawczych, opisanych w ocenianej pracy doktorskiej.

*Po uważnym przestudiowaniu bardzo dobrze opracowanej części teoretycznej pracy mogę stwierdzić, że mgr Kamil Żebracki ma ugruntowaną wiedzę na temat bardzo dużego strukturalnego i funkcjonalnego zróżnicowania chromosomalnych i ekstrakromosomalnych elementów genetycznych bakterii i ich funkcji biologicznych. Zna i rozumie złożone, wciąż nie do końca poznane mechanizmy ich replikacji i segregacji do komórek potomnych. Jego zainteresowanie wzbudziły szczególnie elementy genetyczne Gram-ujemnych bakterii glebowych *Rizobia*, zdolnych do symbiotycznego wiązania azotu z roślinami bobowatymi. Dodam w tym miejscu, że procesy i molekularne mechanizmy symbiotycznego wiązania azotu to jeden z głównych, bardzo owocnych kierunków badań poznawczych, prowadzonych od wielu lat przez znaną w Polsce i w świecie Szkołę Naukową stworzoną w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS.*

Pomimo zgromadzenia już dużej wiedzy na temat roli biologicznej białek RepA i RepB, to jednak, jak pisze Doktorant, „mechanizmy regulacji ekspresji kaset ABC zbadano tylko dla jednego z wielu replikonów pozachromosomowych, współobecnych w tej samej komórce”. Stąd, zgadzam się, że opisany w literaturze mechanizm kontroli oparty na badaniach pojedynczego replikonu (na modelu plazmidu koniugacyjnego pTiR10 *Agrobacterium tumefaciens* i plazmidu p42 *Rizobium etli*) nie wyjaśnia złożoności mechanizmu ekspresji genów czterech kaset *repABC*, współobecnych w komórce *Rizobium leguminosarum* oraz udziału białek RepA w aktywnej, prawidłowej segregacji czterech aż megaplazmidów obecnych w komórkach badanego szczepu *Rizobium*.

Zatem sformułowany cel pracy doktorskiej mgr Kamila Żebrackiego: „Charakterystyka białek RepA kodowanych przez geny kasety repABC Rizobium leguminosarum oraz zbadanie ich roli w regulacji ekspresji genów repABC i aktywnej segregacji czterech replikonów pozachromosomalnych (megaplazmidów pRleTA1a, pRleTA1b, pRleTA1c, pRleTA1d), obecnych w genomie Rizobium leguminosarum R1TA1” – uznaję, po pierwsze, za w pełni uzasadniony, i po drugie, jako bardzo ambitne wyzwanie naukowe o charakterze poznawczym.

Nie mam żadnych uwag krytycznych do sposobu opracowania i bardzo szczegółowych treści obszernego rozdziału *Materiały i Metody*. Nie mam też uwag dotyczących zastosowanych metod i technik badawczych: mikrobiologicznych, genetycznych, molekularnych i informatycznych. Specjalistyczna aparatura zgromadzona w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii i na całym Wydziale Biotechnologii UMCS, wsparta bardzo dużym doświadczeniem zawodowym pracowników naukowych w badaniach mikrobiologicznych, genetycznych i molekularnych układów symbiotycznych, zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego, pozwala mi stwierdzić, że mgr Kamil Żebracki zastosował właściwy warsztat badawczy do realizacji ambitnego celu pracy, pozwalający na uzyskanie w pełni wiarygodnych wyników. Osobiście jestem pod wrażeniem wykorzystanych programów informatycznych, zastosowanych z powodzeniem dla wielu analiz genomicznych *in silico*.

Zwraca uwagę ogrom pracy laboratoryjnej, którą włożył Doktorant w konstrukcję bardzo wielu rekombinowanych plazmidów noszących geny kaset *repABC*, wektorów ekspresyjnych zdolnych do ekspresji białek RepA i RepB oraz ich określonych domen w komórkach *Agrobacterium tumefaciens* i *Escherichia coli*. Wiele prac włożył także oraz badania w układzie dwuhybrydowym oraz w oczyszczanie białek do stanu homogenności dla przeprowadzenia ich wielokierunkowych, specjalistycznych badań w warunkach *in vitro*.

Nie mam wątpliwości, że w czasie Studiów magisterskich na kierunku biotechnologia, następnie Studiów doktoranckich na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS i realizacji pracy doktorskiej w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii mgr Kamil Żebracki nabył bardzo wielu umiejętności i dużego doświadczenia zawodowego w szeroko rozumianej genetyce i biologii molekularnej bakterii.

Rezultaty swojej pracy doktorskiej mgr Kamil Żebracki przedstawił i szczegółowo omówił na 27 stronach rozdziału IV (*Wyniki*), dokumentując rezultaty badań poznawczych uzyskane, na kolejnych dwóch etapach realizacji nakreślonych celów, w postaci czytelnych tabel i kilkunastu rysunków. Za bardzo dobry pomysł, przydatny dla czytelników pracy, a także dla recenzentów, uznaję przygotowanie przez Doktoranta zwięzłego, „treściwego”, autorskiego *Podsumowania* najważniejszych wyników uzyskanych, odpowiednio, na pierwszym i na drugim etapie realizacji celów Jego pracy doktorskiej.

Nie dostrzegam potrzeby bardzo szczegółowej oceny wszystkich wyników udokumentowanych na kolejnych stronach rozdziału *Wyniki*. Istotne są dla mnie najważniejsze ogólne wnioski, które mgr Kamil Żebracki sformułował we wspomnianych wyżej *Podsumowaniach*, a jeszcze bardziej uogólnił je w bardzo dobrze napisanych, krótkich *Streszczeniach*.

Zanim przedstawię moją, subiektywną ocenę na temat najważniejszych, oryginalnych rezultatów pracy doktorskiej mgr Kamila Żebrackiego stawiam pytanie, czy wyniki upowszechnione w światowym obiegu naukowym w postaci zespołowej pracy doświadczalnej w czasopiśmie PloS One (2015), w której jest pierwszym autorem, były uzyskane w ramach Studiów doktoranckich i realizacji celów pracy doktorskiej, czy też Jego Studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Biotechnologii UMCS ?

Za ważny, dobrze udokumentowane wyniki uznaję ustalenie, że geny *repABC* badanych czterech megaplazmidów *Risobium leguminosarum* są zorganizowane w podobne, ale nie identyczne operony, ich transkrypcja jest inicjowana z promotora zlokalizowanego powyżej genu *repA*, a proces transkrypcji podlega negatywnej autoregulacji w wyniku bezpośredniego oddziaływania białek RepA i RepB, z których pierwsze (RepA) wiąże się z sekwencją cetromeropodobną *parS*, drugie zaś (RepB) w wyniku współdziałania z pierwszym jako korepresor. Zgadzam się z Doktorantem, który w *Dyskusji* pisze, że nieco odmienny sposób regulacji aktywności transkrypcyjnej poszczególnych kaset *repABC* może być wynikiem „pewnego zróżnicowania sekwencji aminokwasowej kodowanych przez nie białek RepA i RepB oraz nieco odmiennej organizacji regionów promotorowo - operatorowych”. Zgodnie z moją wiedzą ten bardzo ciekawy, złożony mechanizm regulacji aktywności transkrypcyjnej, spełnia szczególnie ważną rolę biologiczną w populacjach bakterii środowiskowych.

Wysoko oceniam rezultaty bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń, przeprowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, które pozwoliły mgr Kamilowi Żebrackiemu uzyskać na modelu *Risobium leguminosarum* RtTA1 bardzo wartościowe, oryginalne wyniki, wzbogacające światową wiedzę na temat molekularnych mechanizmów, pozwalających na zgodne, stabilne funkcjonowanie w jednej komórce bakterii wieloczęściowego genomu, to jest chromosomu i wielu pozachromosomalnych replikonów. Postawienie takiego, w pełni uprawnionego wniosku, było możliwe w oparciu o wyniki uzyskane w badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vitro*, a co ważne, potwierdzonych *in vivo* przy zastosowaniu systemu dwuhybrydowego. Okazało się, że oddziaływania pomiędzy syntetyzowanymi w komórce białkami RepA i sekwencjami operatorów są bardzo specyficzne i zachodzą pomiędzy tymi elementami jedynie wtedy, gdy pochodzą one z tego samego plazmidu.

Do późnych lat mojej pracy i kariery naukowej byłem zawsze zamiłowany w pracy laboratoryjnej, która przyniosła mi wiele radości i zawodowych sukcesów, ale czasami była także bardzo stresująca, a zwłaszcza wówczas, gdy doświadczalna weryfikacja postawionych hipotez badawczych nie przynosiła mi bardzo oczekiwanych wyników!

Panie Kamile, proszę mi powiedzieć w czasie publicznej obrony pracy, które z opisanych w rozprawie doktorskiej rezultatów przyniosły Panu najwięcej radości, na miarę „tańca na blacie stołu laboratoryjnego” w rytm melodii rozpoznawanej przez Pana, jak wiem, zawsze „po jednej nutce”, a które były dla Pana i Promotora ciężko wypracowaną, stresującą „krwawicą” ?

Podobała mi się profesjonalnie napisana, dość obszerna *Dyskusja* (12 stron), w której Doktorant umiejętnie wkomponował własne wyniki w ogólnoswiatową wiedzę na temat organizacji i mechanizmów regulacji ekspresji genów bakteryjnych kaset genów *repABC*. Niektóre wyniki opisane w rozprawie doktorskiej potwierdzają ustalenia innych autorów, znaczna część wyników bez wątpienia rozszerza wiedzę o złożonych mechanizmach regulacji transkrypcji genów *repABC* oraz stabilnej replikacji i segregacji plazmidów w wieloczęściowych, bardzo złożonych genomach bakterii. W końcowej części *Dyskusji* mgr Kamil Żebracki niejako zapowiada podjęcie prób konstrukcji zgodnych wektorów opartych na różnych kasetach *repABC*, które mogłyby funkcjonować w jednej komórce - jako świetne „narzędzia” w różnych badaniach podstawowych i aplikacyjnych.

Życzę mgr Kamilowi Żebrackiemu powodzenia w realizacji tego pomysłu po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych. Myślę, że jako życzliwy recenzent dla Jego bardzo wartościowej rozprawy doktorskiej otrzymam taki wektor/wektory dla Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego - w prezencie ?

W oparciu o dokonaną analizę rezultatów przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pana mgr Kamila Żebrackiego, a także wyników opublikowanych w 2015 roku w czasopiśmie PLoS One, w której jest pierwszym autorem, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie formalne i naukowe 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 naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Kamila Żebrackiego do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także do Wysokiej Radę o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia tej bardzo wartościowej pracy doktorskiej oraz utalentowanego Doktoranta, ze względu na podjęcie nie tylko bardzo interesującego tematu o charakterze poznawczym, ale także z uwagi na wartość naukową uzyskanych wyników, w tym upowszechnionych w 2015 roku w międzynarodowym obiegu naukowych w postaci wspomnianej wyżej, autorskiej pracy doświadczalnej opublikowanej w „rankingowym”, specjalistycznym czasopiśmie naukowym PLoS One. Wyrażam przekonanie, że kolejne, komentowane w recenzji oryginalne wyniki Jego pracy doktorskiej, zostaną także wkrótce opublikowane. Jak wspominałem wcześniej, mgr Kamil Żebracki jest również współautorem 6 innych wartościowych prac doświadczalnych, opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, ale nie związanych bezpośrednio z tematem i celami Jego pracy doktorskiej, a także 3 artykułów przeglądowych [Post Microbil, Acta Mol cel Biol lipids, Genes (Basel)].