



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

Dr hab. inż. Paweł Sachadyn  
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii  
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
email: psach@pg.gda.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 12 września 2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Olgi Żołnierkiewicz pt. „Chemiczna synteza zoptymalizowanego genu *taqIIIRM*: otrzymywanie aktywnego biologicznie bifunkcyjnego białka oraz kontrolowana zmiana specyficzności enzymatycznej, sterowana analogami kofaktora”**

Rozprawa doktorska mgr Olgi Żołnierkiewicz pt. „Chemiczna synteza zoptymalizowanego genu *taqIIIRM*: otrzymywanie aktywnego biologicznie bifunkcyjnego białka oraz kontrolowana zmiana specyficzności enzymatycznej, sterowana analogami kofaktora” wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora Prof. Piotra Skowrona i promotora pomocniczego dr Agnieszki Żylicz-Stachuli poświęcona jest biotechnologicznej produkcji i badaniu aktywności endonukleazowej restryktazy TaqII z *Thermus aquaticus*. Praca ta stanowi cenny wkład do niezwykle bogatego dorobku będącego efektem badań nad endonukleazami restrykcyjnymi, które są prowadzone w zespole prof. Piotra Skowrona przy istotnym udziale pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli.

Cele pracy obejmowały charakterystykę działania endonukleazy restrykcyjnej TaqII termofilnej bakterii *Thermus aquaticus* YT-1 ze szczególnym uwzględnieniem aktywności niespecyficznej oraz konstrukcję nowego systemu ekspresyjnego do wydajnej produkcji białka TaqII w komórkach *E. coli* w oparciu o wykorzystanie genu *taqIIIRM* o zoptymalizowanej sekwencji nukleotydowej.

Rozprawa doktorska mgr Olgi Żołnierkiewicz liczy 187 stron i składa się z następujących rozdziałów: „Spis Treści”, „Cele”, „Streszczenie”, „Wprowadzenie” (24 strony), „Materiały” (21 stron), „Metody” (38 stron), „Wyniki” (48 stron) i „Dyskusja” (20 stron), „Podsumowanie” (2 strony), „Wykaz skrótów”, spis tabel, rysunków i wykresów, „Literatura i strony internetowe” (16 stron, 255 pozycje literaturowe i 11 stron internetowych) oraz „Publikacje”, czyli spis artykułów opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej, których Olga Żołnierkiewicz jest

współautorką. W manuskrypcie zamieszczono liczne ilustracje w postaci 11 wykresów, 24 rysunków, 32 elektroforegramów i 2 fluorogramów oraz dwa równania i 51 tabel.

We wprowadzeniu do rozprawy Doktorantka ujęła przydatne informacje dotyczące organizmów termofilnych, charakterystyki naturalnego gospodarza enzymu TaqII, czyli bakterii *Thermus*, zwięzłe omówienie działania, znaczenia i typów systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych, charakterystykę systemów RM typu II i prezentację restryktaz rodziny *Thermus*. Ponadto Autorka szczegółowo dyskutuje zjawisko aktywności niespecyficznego restryktaz. „Wprowadzenie” zamyka bardzo zajmujący rozdział dotyczący biologii syntetycznej, który jest nawiązaniem do przedstawionej w rozprawie sztucznej syntezy genu. Wprowadzenie nie ogranicza się więc do niezbędnych informacji podstawowych, ale ukazuje czytelnikowi temat w szerszym, interesującym kontekście. Do tej części pracy mam tylko jedną marginalną uwagę: wspomniany na s. 29. brak patogenności u *E. coli* dotyczy szczepów laboratoryjnych, ale należy pamiętać, że istnieją też szczepy wywołujące groźne zatrucia pokarmowe.

„Materiały” oraz „Metody” zawierają wykazy i opisy użytych materiałów, instrumentów oraz metod laboratoryjnych. Dobór i opis metodyki nie budzą zastrzeżeń, a staranne i wyczerpujące objaśnienia zasługują na wysoką ocenę. Jednak spis programów komputerowych i aparatury powinny zostać włączone do rozdziału dotyczącego metod, nie materiałów. W tym rozdziale dostrzegłem jeszcze dwie drobne nieścisłości. Na s. 59 Doktorantka pisze o izolacji genomowego DNA z hepatocytów, gdy faktycznie do ekstrakcji DNA użyto próbki wątroby, w skład której wchodzi także inne typy komórek. Jest bardzo mało prawdopodobne, że wartość współczynnika R<sub>2</sub> wyznaczona dla krzywej wzorcowej wynosi dokładnie 1, jak podano na Wyk. 4.2 na s. 89, choć może być jej bardzo bliska, co można zaznaczyć np. zapisem „1,000”.

W rozdziale „Wyniki”, w sposób zarazem przejrzysty i szczegółowy, mgr Żołnierkiewicz przedstawia liczne eksperymenty wykonane w ramach pracy doktorskiej i ich wyniki. Rozdział jest bogato ilustrowany schematami, wykresami i zdjęciami żeli elektroforetycznych. Wysoko oceniam duży nakład pracy laboratoryjnej, świetnie zaprojektowane eksperymenty, ich perfekcyjne wykonanie oraz nie mniej perfekcyjną dokumentację. Znakomite, gdyż precyzyjne i jednocześnie klarowne, są objaśnienia żeli elektroforetycznych, które obrazują rezultaty bardzo złożonych doświadczeń. Opis i interpretacja wyników nie budzą zastrzeżeń. Należy również docenić, że oprócz należących do tradycyjnego warsztatu biologii molekularnej technik elektroforetycznych, którymi Doktorantka znakomicie się posługuje, w pracy wykorzystano też metody nowoczesne, jak sekwencjonowanie drugiej generacji, czy sztuczna synteza genu.

Chciałbym jednak zwrócić uwagę, że nie przedstawiono replikatów technicznych eksperymentów, a co za tym idzie, nie można oszacować dokładności oznaczeń i wyznaczyć istotności statystycznej. Trzeba tu podkreślić, że Doktorantka oznaczała przeważnie zależność aktywności endonukleazowej od wzrastających wartości różnych zmiennych, jak np. pH czy siła jonowa, i obserwowała wyraźne trendy, co wskazuje, że prawidłowo oceniała wpływ badanych czynników. Z drugiej strony bez wyznaczenia błędu metody, trudno jednoznacznie ocenić, czy aktywność względna TaqII w pH 7,5 jest faktycznie wyższa niż w pH 8,0, skoro różnica wynosi zaledwie 8,2%.

Stwierdzenie, że uzyskano homogeny preparat białka TaqII (s. 135) na podstawie elektroforegramu Ele 5.27 nie jest dostatecznie uzasadnione. W celu oszacowania stopnia czystości preparatu na podstawie analizy żelu barwionego kumasyną wskazane byłoby nałożenie znacznie większej ilości białka niż 2 µg, co zwiększyłoby szanse na wykrycie zanieczyszczeń.

Chociaż opisany projekt optymalizacji definiuje jednoznacznie sekwencję nukleotydową genu *taqIIIRM*, warto byłoby tę sekwencję zamieścić w rozprawie.

„Dyskusja” zwraca uwagę swoją wnikliwością i wartościowymi dodatkami, jak np. omówienie podstaw termostabilności białek i tabelaryczne zestawienie molekularnych mechanizmów tego zjawiska wykonane przez Autorkę. Szczególną uwagę zwraca też rozdział 6.3.1 poświęcony hiperplastycznej aktywności restryktazy TaqII, w którym wyczerpująco analizowane są aspekty molekularne aktywności niespecyficzej. Skomplikowane rozważania mechanistyczne kończy przystępne podsumowanie w postaci krótkiej tabeli prezentującej wpływ S-adenozylometioniny oraz jej analogów na aktywność metylotransferazy i restryktazy dwufunkcyjnych enzymów występujących w bakterii rodzaju *Thermus*. Dobrym pomysłem jest przedyskutowanie potencjalnych aplikacji enzymu TaqII, wątpliwość budzi jednak pomysł zastosowania jego aktywności niespecyficzej do fragmentacji genomowego DNA w celu przygotowania bibliotek do sekwencjonowania nowej generacji, podczas gdy z powodzeniem używana jest do tego sonikacja. Liczba 255 pozycji bibliograficznych świadczy o głębokich i wielostronnych studiach literaturowych wykonanych przez Doktorantkę, zarówno do przygotowania wprowadzenia, jak i dyskusji.

Opis i dyskusja skomplikowanych eksperymentów i zagadnień molekularnych w rozprawie doktorskiej mgr Żołnierkiewicz są precyzyjne i przejrzyste. Autorka sprawnie posługuje się bogatą terminologią naukową. Na tym tle zaskakuje nietrafny tytuł rozprawy. Po pierwsze, wyrażenie „chemiczna synteza genu *taqIIIRM*” jest mylące, gdyż praca nie dotyczyła syntezy DNA, której wykonanie zlecono w ramach usługi komercyjnej, ale konstrukcji układu ekspresyjnego. Po drugie, uzyskanie sztucznego genu obejmowało nie tylko etap syntezy chemicznej, ale także etap syntezy enzymatycznej. Po trzecie, otrzymywanie i badanie enzymu ujęte w drugiej, zapisanej po dwukropku, części tytułu, nie stanowią etapów syntezy genu, do której odnosi się część pierwsza. Niezręczne są też wyrażenia „zaobserwowano brak” (s. 92) oraz „stwierdzono brak produktów reakcji trawienia” (s. 104). Nie wnikając w semantyczne rozważania, czy brak można zaobserwować, w opisie wyników naukowych lepiej użyć zwrotu „nie zaobserwowano”.

Rozprawa prezentuje bardzo wysoki poziom edytorski. Autorka nie ustrzegła się jednak pewnej liczby, wymienionych poniżej, drobnych potknięć językowych lub typograficznych, które, jak chcę podkreślić, nie mają istotnego znaczenia wobec wielkiej staranności w przygotowaniu pracy, zwłaszcza opisach eksperymentów.

- s. 16 - „gen kodujący spektomycynę (będącego donorem ...)”;
- s. 17 - „DNA wirusy” zamiast „wirusy DNA”;
- s. 24 - „brak danych ... spowodowało”;
- s. 25 - „struktura kompleksu... ulegały”;

- s. 28 – „izolowanie białek ... jest utrudniona”;
- s. 29 - „wyciszała transkrypcję białka”;
- s. 29 - użycie terminu „substrat” na określenie podłoża do hodowli bakterii;
- s. 48, 49 – „akrylamidy”, „poliakrylamidowy”, choć przeważnie używana jest poprawna forma poliakryloamidowy;
- s. 64 - „dNTPsów”;
- s. 64, 101, 139 - użycie skrótu „godz.” zamiast „h”;
- s. 103 - urwany opis żelu Ele 5.6;
- s.111 – „wynik reakcji PCR z kolonii bakteryjnych” – zamiast „wynik selekcji klonów rekombinantowych przy użyciu PCR”;
- s. 117 – „smugi na żelu agarozowym”;
- s. 123 - „Z pośród”;
- s. 140 - „ $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ ” i „ $\text{NH}_3^+$ ”;
- s. 141 - „które by tłumaczyłyby”;
- s. 142 - „entropi”;
- s. 149 – „obecność drugiej obszaru”;
- s. 154 i 158 - brak przecinka przed „jak” w konstrukcji „zarówno... ,jak...”;
- s. 160 - „stymuluje powstanie 4-krotnego wzrostu”.

Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 7 publikacji z listy filadelfijskiej, w tym trzy bezpośrednio związane z tematem rozprawy. W sześciu z tych prac pani Olga Żołnierkiewicz jest druga na liście autorów, co świadczy o jej znaczącym udziale. Warto odnotować, że dwa z tych artykułów opublikowano w czasopismach „*BMC Genomics*” i „*Microbial Cell Factories*” zajmujących pozycje w pierwszym kwartylu rankingu czasopism w swoich dziedzinach. Trzy inne artykuły także dotyczą tematyki endonukleaz restrykcyjnych, a kolejny badań nad owadami. Taki wynik publikacyjny świadczy o dużej aktywności i zaangażowaniu Doktorantki, zarówno w prace nad własnym tematem, jak i w innych projektach naukowych.

Lektura rozprawy mgr Żołnierkiewicz zainspirowała mnie do zadania następujących pytań:

1. Czy odległość miejsca trawienia od sekwencji rozpoznania enzymu restrykcyjnego może ulegać relaksacji?
2. Czy relaksacji może ulegać też specyficzność metylotransferazy DNA?
3. Intrygująca jest obserwacja, że enzym TaqII otrzymywany w *E. coli* w ramach tej pracy nie trawi drugiej sekwencji kanonicznej CACCCA wyznaczonej przez Barkera i wsp. (PMID: 6087291). Jednak Barker jako substratu TaqII użył plazmidu pBR322, a Doktorantka opisuje trawienie liniowych produktów PCR amplifikowanych na matrycy tego plazmidu. Czy Doktorantka trawiła enzymem TaqII DNA natywnego plazmidu pBR322? Czy jest możliwy wpływ superskręcenia plazmidowego DNA na działanie TaqII? Czy jest możliwe, że sekwencja CACCCA indukuje trawienie tylko jednej nici DNA, co można obserwować w żelu

sekwencyjnym denaturującym stosowanym w pracy Barkera, ale nie w elektroforezie w warunkach niedenaturujących?

4. Autorka opisuje szereg potencjalnych aplikacji aktywności niespecyficznego enzymów restrykcyjnych. Jakie zastosowania aktywności niespecyficznego endonukleazy są obecnie w użyciu?
5. Cennym osiągnięciem pracy jest uzyskanie efektywnej produkcji toksycznego białka TaqII w *E. coli*. Czy można porównać wydajność produkcji tego układu z innymi systemami do produkcji podobnych białek toksycznych?

Podsumowując moją ocenę rozprawy, chcę podkreślić, że praca mgr Olgi Żołnierkiewicz zawiera istotne elementy nowości naukowej, jak charakterystyka warunków stymulacji aktywności niespecyficznego endonukleazy TaqII oraz konstrukcja nowego systemu ekspresji do produkcji białka toksycznego w komórkach *E. coli*. Na szczególne uznanie zasługuje szeroki zakres świetnie zaprojektowanych, wykonanych i udokumentowanych eksperymentów oraz ich niezwykle staranny opis. Dorobek publikacyjny i wysoka jakość rozprawy doktorskiej p. Żołnierkiewicz zasługują na wyróżnienie, niemniej jednak z uwagi na formalne wymogi wyróżnienia rozprawy doktorskiej obowiązujące na Wydziale Chemii UG, postawienie formalnego wniosku w tej sprawie nie jest możliwe.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Olgi Żołnierkiewicz pt. „Chemiczna synteza zoptymalizowanego genu *taqIIIRM*: otrzymywanie aktywnego biologicznie bifunkcyjnego białka oraz kontrolowana zmiana specyficzności enzymatycznej, sterowana analogami kofaktora” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Olgi Żołnierkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

