

Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
Ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk, Polska
Tel.: (58) 347 15 96
Fax: (+48) (58) 347 11 44
e-mail: chemmbag@pg.edu.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk, 15.05.2019 r.

**Recenzja pracy doktorskiej
Mgr. Edyty Czajkowskiej**

Pt.:

**Identyfikacja, klonowanie i ekspresja nowego genu *taqIIIRM* z termofilnej bakterii
Thermus aquaticus na podstawie analizy bioinformatycznej sekwencji genomu,
uzyskanej metodami sekwencjonowania nowej generacji**

Przedstawiona do recenzji praca stanowi omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr Czajkowską pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Żylicz-Stachuli, prof. UG w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Celem pracy *sensu largo* było znalezienie i scharakteryzowanie pod względem biochemicznym nowego narzędzia molekularnego do manipulacji DNA, które to narzędzie może być potencjalnie przydatne w badaniach genomowych, metagenomicznych, w diagnostyce molekularnej i w inżynierii genetycznej. W szczególności Doktorantka w pracy zajmowała się weryfikacją postawionej wcześniej hipotezy badawczej, która zakładała istnienie w genomie bakterii *T. aquaticus* YT-1 ortologicznego genu *taqIIIRM*, kodującego białko RM.TaqIII. W 1984 r. Baker i współpracownicy wyizolowali i scharakteryzowali enzym RM.TaqII oraz wykazali, że enzym ten rozpoznaje specyficznie dwie sekwencje DNA 5'-GACCGA-3' i 5'-CACCCA-3'. Enzym ten posiadał dwie aktywności enzymatyczne: metylotransferazy (MTazę) oraz endonukleazy restrykcyjnej (REazę). Prace w zespole dr hab. Żylicz-Stachuli doprowadziły do sklonowania genu *taqIIIRM* do bakterii *Escherichia coli*, przy czym uzyskany w ten sposób rekombinowany enzym RM.TaqII rozpoznawał tylko jedną sekwencję, a mianowicie 5'-GACCGA-3'. Stąd pojawiła się hipoteza, że można przypuszczać iż musi istnieć ortologiczny gen, którego produktem jest enzym rozpoznający tą drugą sekwencję DNA, czyli 5'-CACCCA-3'.

Na samym początku swojej recenzji chciałbym zaznaczyć, że cel pracy mimo, że taki prosty w zdefiniowaniu, były bardzo ambitny, pracochłonny i trudny do wykonania ale, co warto podkreślić, w całości został zrealizowany. Praca miała charakter multidyscyplinarny i obejmowała bioinformatykę, mikrobiologię, biologię molekularną, biochemię oraz chemię analityczną. Doktorantka wykonała złożoną analizę bioinformatyczną zsekwencjonowanego genomu *T. Aquaticus* i zlokalizowała gen *taqIIIRM*. Następnie sklonowała ten gen do bakterii *E. coli* i dokonała jego ekspresji. W dalszej kolejności oczyściła rekombinowany enzym RM.TaqIII do homogeniczności funkcjonalnej. W ten sposób uzyskany preparat został przez nią użyty do potwierdzenia sekwencji DNA rozpoznawanej przez REazę RM.TaqIII 5'-CACCCA-3'. Doktorantka wszystkie eksperymenty wykonała samodzielnie, a jedynie

w niektórych obszarach korzystała z komercyjnych analiz wykonanych przez zewnętrzne firmy (sekwencjonowanie nowej generacji). Udział tych wszystkich zewnętrznych firm został poprawnie odnotowany w pracy.

Na szczególnie podkreślenie zasługuje element nowości naukowej zaprezentowany w pracy. Oceniając bowiem sam cel pracy i ogólnie jego realizację muszę powiedzieć, że byłem pod wrażeniem nowatorstwa (również w aspekcie stawiania hipotezy), jak i ogromu pracy, którą Doktorantka musiała włożyć aby zrealizować ten cel. W szczególności budzi podziw zastosowanie rozległej analizy bioinformatycznej i metod sekwencjonowania nowej generacji. Przy czym na pewno oprócz wiedzy i umiejętności oraz pracowitości potrzeba było trochę szczęścia w tych badaniach, gdyż w sumie postawiona hipoteza została eksperymentalnie potwierdzona, a znalezienie ortologicznego genu i jego produktu posiadającego specyficzną funkcję REazy jest na pewno sukcesem w poszukiwaniu nowych systemów do manipulacji DNA. W tym obszarze zespół dr hab. A. Żylicz-Stachuli jak i prof. P. Skowrona już odnotował wiele sukcesów. Obecna praca jest kolejnym, który w dalszej perspektywie może znaleźć przełożenie na praktyczne zastosowanie.

Układ pracy:

Na początku chciałbym nadmienić, że pracę bardzo dobrze czyta się mimo, że jest stosunkowo długa i zawiera ogromną ilość detali. Praca ma klasyczny układ dla tego typu prac eksperymentalnych. Na początku przedstawiony jest zwięzły cel pracy. Można nawet powiedzieć, że nazbyt zwięzły bo w punktach. Następnie umieszczone jest streszczenie w j. polskim, po którym znajduje się obszerny i bardzo merytorycznie związany z celem pracy wstęp teoretyczny. Po wstępie następuje rozdział przedstawiający materiały a kolejny przedstawia metody. Przy czym, ten ostatni rozdział osobno przedstawia metody z obszaru mikrobiologii, metody wykorzystywane podczas pracy z DNA (w tym sekwencjonowanie nowej generacji) i metody stosowane podczas pracy z białkami, jak również osobno metody z zakresy bioinformatyki. Następnie Doktorantka przedstawia rozdział z wynikami i dyskusją z podziałem na poszczególne etapy badań. Na końcu jest podsumowanie, spis rysunków, tabel i fotografii oraz spis literatury zawierający 102 pozycje. Po spisie literatury znajduje się spis stron internetowych zawierających różne programy i bazy bioinformatyczne.

W stosunku do układu pracy i jej formalnej zawartości mam pewne uwagi. Jako recenzent wielu różnych prac, muszę w tym miejscu odnotować, że doktoranci i magistranci nie potrafią poprawnie opisać językowo celu pracy myląc go z zakresem pracy, tak jak to ma miejsce również w tym przypadku. Celem obecnej pracy bowiem nie było, po kolei wykonanie tych wszystkich zadań jak to zostało napisane przez mgr Czajkowską na str. 8, lecz weryfikacja hipotezy badawczej. W celu powinna być przedstawiona ta hipoteza. Jest to tym bardziej dziwne, że w podsumowaniu Doktorantka już właściwie przedstawia cel swojej pracy. Dodatkowo zauważyłem, że w pracy nie ma streszczenia w j. angielskim. Praca też nie zawiera osobnego spisu osiągnięć Doktorantki w postaci publikacji czy też doniesień konferencyjnych, który to spis znajdowałby się w samej pracy. Jedynie w podsumowaniu jest zawarta informacja, że wyniki pracy zostały opublikowane, a do pracy doktorskiej na osobnych stronach dołączony jest spis dorobku Doktorantki.

Jeżeli chodzi o ogólną ocenę poszczególnych rozdziałów to treść ich jest bardzo merytoryczna. Zwłaszcza wstęp jest bardzo dobrze napisany i wprowadza czytelnika w tematykę zarówno enzymów termofilnych jak i generalnie tematykę poszukiwania nowych enzymów poprzez analizę genomu, transkryptomu i proteomu. Bardzo merytorycznie opisano również we wstępie systemy RM. Generalnie do tych opisów nie mam większych uwag. Listę uwag bardziej szczegółowych i pytań przedstawię poniżej. Rozdziały dotyczące materiałów i metod są bardzo wyczerpująco napisane. Wszystkie metody są jasno i przystępnie opisane jak również całe postępowanie eksperymentalne jest tak przedstawione, że inne osoby nie powinny mieć problemów z powtórzeniem poszczególnych eksperymentów. Dobór metod jest właściwy. Na wielu etapach pracy stosowano różne metody aby ustalić jednoznacznie

odpowiednie dane. Na szczególną pochwałę zasługuje rozległa analiza bioinformatyczna i zastosowanie dwóch metod sekwencjonowania nowej generacji. Dopiero zastosowanie tych metod dało jednoznaczne wyniki oraz m.in. doprowadziło do stwierdzenia kontaminacji próbki badanego DNA.

Na wyróżnienie zasługują rozdziały z przedstawieniem i dyskusją wyników. Rozdziały te są również bardzo przejrzyste napisane. Przedstawione dane nie budzą wątpliwości. Ich prezentacja jest profesjonalna i zawiera bardzo dużo szczegółów ważnych z punktu widzenia eksperymentalnego.

W całej pracy znajduje się też wiele odniesień do źródłowej (trochę starszej) i bieżącej literatury (wiele prac pochodzi z ostatnich lat) co wskazuje na rozległą wiedzę Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Przegląd literaturowy i analiza danych w dziedzinie objętej badaniami jest wnikliwa i ściśle związana z poszczególnymi zagadnieniami podejmowanymi w pracy doktorskiej.

Warto też pochwalić edytorski aspekt pracy związany z prezentacją rysunków, wykresów, schematów oraz tabel. Wszystkie rysunki są profesjonalnie przedstawione i posiadają bardzo dobre opisy, w których tam gdzie jest uzasadnione używa się kolorów dla ułatwienia czytania informacji. Jeżeli chodzi o sam język pracy to jest bardzo poprawny. Znalazłem jedynie kilka błędów stylistycznych i tak zwanych literówek, co przy tak długim tekście jest trudne do uniknięcia.

Uwagi i komentarze ogólne:

Tak jak wspomniałem na wstępie praca jest bardzo ciekawa i nowatorska, a jej wyniki istotne ze względu na postęp wiedzy w dziedzinie tworzenia nowych narzędzi do manipulacji DNA. Autorce udało się zweryfikować hipotezę o istnieniu ortologicznego genu *taqIIIRM* i scharakteryzować jego produkt, który m.in. może być nowym narzędziem do takiej manipulacji DNA. Praca Doktorantki z tego względu niesie duży element nowości naukowej. Do tej części pracy będącej dyskusją i takiego przedstawienia wyników nie mam jako recenzent zastrzeżeń. Wyniki tej pracy zwłaszcza, że zostały już w części opublikowane w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acid Research* (pozycja 79 w spisie literatury) stanowią istotny wkład w poznanie i rozwój narzędzi biologii molekularnej.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zwrócić uwagę, że czytając pracę znalazłem dosłownie tylko kilka różnych miejsc, co do których mam pewne uwagi mniej lub bardziej szczegółowe (w tym edytorskie).

Uwagi bardziej generalne:

Pytanie generalne? W związku z potwierdzeniem hipotezy o istnieniu genu ortologicznego oraz w związku z wyizolowaniem jego produktu i potwierdzeniem aktywności znalezionej enzymu RM.TaqIII to jakie znaczenie ma to odkrycie i jakie potencjalne praktyczne zastosowanie widzi Doktorantka?

Strona 95:

Autorka pracy pisze w paragrafie 5.5, że podczas sekwencjonowania genomu *T. Aquaticus* YT-1 na platformie Pacific Bioscience wykryto kontaminację próbki DNA drugim gatunkiem bakterii. W dalszych badaniach Doktorantka ustala, że jest to DNA bakterii *Geobacillus kaustophilus*. Chciałem w związku z tym zadać pytanie, być może trochę naiwne, czy można na podstawie wszystkich przeprowadzonych badań wykluczyć, że znaleziony ortologiczny gen *taqIIIRM* nie należy do właśnie tej bakterii?

Uwagi bardziej szczegółowe:

Np. Strona 22-24:

Autorka niezbyt poprawnie cytuje publikacje. Np. na stronie 22 wspomina o odkryciu bakterii *T. aquaticus* w 1969 r. w parku Yellowstone, ale nie podaje odnośnika literaturowego. Natomiast np. na str. 23 mówi o wprowadzeniu nazwy plazmid przez Lederberga w 1952 r., ale cytuje pracę Włodarczyka i współpracowników z 2005 r. Podobnie na str. 24 Autorka pisze, że plazmidy liniowe odkryto we wczesnych latach 80-tych, a cytuje pracę Meinhardt i współpracowników z 1997 r.

Strona 77:

Tytuł paragrafu 5.3 oraz informacja początkowa w nim zawarta nie jest dość precyzyjna. Mowa jest o sekwencjonowaniu DNA, ale nie wiadomo czy chodzi o genomowe czy plazmidowe DNA, czy o oba typy DNA. Moja uwaga wynika z tego, że w innych paragrafach jest to przedstawione precyzyjnie.

Spis literatury:

Mimo, że spis literatury zawiera 102 pozycje to jako recenzent mam pewien niedosyt, że w takiej pracy o szerokim aspekcie tematycznym i metodycznym nie ma więcej odnośników do literatury. Nie jest to jakiś poważny zarzut, ale w pracach doktorskich tego typu raczej do normy należy cytowanie ponad 200 prac.

Generalna uwaga co do przedstawiania stron domowych w spisie:

Odnośniki w spisie literatury do stron domowych czy też baz danych powinny mieć daty, gdyż niestety niektóre takie pozycje stają się nieaktualne z czasem.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych nielicznych uwag krytycznych przedstawionych powyżej, w większości edytorskich, wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę Pani mgr. Edyty Czajkowskiej. Zwłaszcza duży wkład nowości naukowej i osiągnięcie w pełni postawionego sobie ambitnego celu jest przeze mnie wysoko ocenione. Można powiedzieć, że jest to, użyję słowa „bardzo zgrabna praca”. Postawiono bowiem hipotezę badawczą i następnie krok po kroku ją weryfikowano stosując ang. „state-of-the-art” podejście – takie jakie stosuje się w szeroko pojętym świecie. Cieszy zatem fakt, że w Polsce można nie tylko stawiać takie ambitne hipotezy, ale móc je zweryfikować i osiągnięcie to opublikować w prestiżowym czasopiśmie z dziedziny. Reasumując sama praca stanowi dokumentację oryginalnych badań prowadzonych przez Doktorantkę, które zostały opublikowane, co stanowi o wysokich walorach naukowych i dużym wkładzie nowości naukowej całej pracy.

Moim zdaniem zatem praca doktorska Pani Czajkowskiej całkowicie, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w pkt. 13 Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę w szeroko pojętej dziedzinie biologii molekularnej. W toku realizacji pracy wykazała Ona również umiejętność samodzielnego prowadzenia skomplikowanych badań naukowych z wykorzystaniem różnych technik. Z podanych wyżej względów wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Edyty Czajkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Dąbrowska