



POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. inż. Paweł Sachadyn

Katedra Mikrobiologii

Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

email: psach@pg.gda.pl, tel. 58 3471605

Gdańsk, 29 maja 2014

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Roberta Michała Boratyńskiego pt. „Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS”

Rozprawa doktorska mgr Roberta Michała Boratyńskiego pod tytułem „Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS” wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora Prof. Piotra Skowrona i promotora pomocniczego dr Agnieszki Żylicz-Stachuli dotyczy badań nad endonukleazą Bill oraz fuzyjnym systemem restrykcji-modyfikacji TspDTI.

Praca wykonana przez mgr Boratyńskiego należy nurtu badań nad endonukleazami restrykcyjnymi, które od lat z sukcesem prowadzone są w zespole prof. Piotra Skowrona i stanowią zarazem tematykę badawczą promotora pomocniczego pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli, która wniosła do tych badań znaczny wkład, w szczególności w postaci serii publikacji dotyczącej białka TspDTI.

Cele pracy obejmowały charakterystykę endonukleazy restrykcyjnej Bill znalezionej w termofilnej bakterii *Bacillus ilicheniformis* wyizolowanej z próbki gleby pobranej na terenie pustynnej oazy w Egipcie, oraz wykonanie mutagenезy ukierunkowanej genu *tspDTIRM* z *Thermus* sp. DT i zbadanie uzyskanych wariantów mutacyjnych białka TspDTI. Doktorant wykonał postawione zadania przeprowadzając szereg pracochłonnych eksperymentów przy użyciu różnych technik biologii molekularnej.

Rozprawa doktorska mgr Roberta M. Boratyńskiego liczy 172 strony i składa się z następujących rozdziałów: Spis Treści, Cele pracy, Wstęp (20 stron), Materiały (17 stron), Metody (23 strony), Wyniki i Dyskusja (82 strony), Podsumowanie, Stosowane Skróty, Literatura (13 stron). W manuskrypcie umieszczono 73 ryciny i 8 tabel.

Można by oczekiwać, że wstęp pracy poświęconej charakterystyce kolejnej endonukleazy restrykcyjnej stanowi jedynie przedstawienie stanu wiedzy i objaśnienie niezbędnych pojęć. Tymczasem Doktorantowi udało tu stworzyć zajmujący esej, którego lektura powinna zainteresować wielu czytelników i zmienić pojęcie o enzymach restrykcyjnych badacza, który używał ich dotąd wyłącznie jako narzędzi molekularnych do klonowania lub analizy DNA. Pasjonujący jest fragment o mechanizmach utrzymywania systemów restrykcji i modyfikacji w genomach mikroorganizmów, świetnie przygotowane jest też omówienie mechanizmów regulacji ekspresji genów kodujących endonukleazy restrykcyjne. Bardzo oryginalne i cenne są nawiązania do historii odkryć naukowych, wśród nich odwołanie do odkrycia enzymów restrykcyjnych i metody chromatografii oraz cytowania oryginalnych prac Lurii i Humana z 1952 oraz Cweta z 1905. Myślę, że w monografii o enzymach restrykcyjnych, fragmenty wstępu rozprawy doktorskiej R. M. Boratyńskiego byłyby cennym wkładem. Wstęp zawiera też przydatne, szczegółowe zestawienie znanych systemów restrykcji i modyfikacji.

Dwa kolejne rozdziały, Materiały oraz Metody, liczące łącznie 40 stron, stanowią bardzo starannie przygotowane wykazy i opisy użytych materiałów, instrumentów oraz metod laboratoryjnych. Dobór i opis metodyki nie budzi zastrzeżeń, a dbałość o szczegóły zasługuje na uznanie.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” na 82 stronach opisany jest szeroki zakres eksperymentów, który obejmował produkcję, oczyszczanie i charakterystykę endonukleazy BllI z komórek naturalnego gospodarza, otrzymywanie i oczyszczanie białka TspDTI z komórek nadprodukującego szczepu *E. coli*, a także charakterystykę tego enzymu oraz otrzymanie przy użyciu mutagenyzy ukierunkowanej trzech zmutowanych form białka TspDTI i zbadanie ich właściwości. Rozdział jest ilustrowany schematami, wykresami, zdjęciami żeli elektroforetycznych umieszczonymi na 71 rycinach, w tym 70 oryginalnych, sporządzonych przez Autora.

Opis i dyskusja rezultatów są szczegółowe, świadczą o dużym wysiłku Autora, aby wiernie i dokładnie omówić wykonane eksperymenty. Na szczególną uwagę zasługuje tu analiza porównawcza aktywności restrykcyjnej enzymu TspDTI oraz jego wariantu zmutowanego TspDTI-APPW pozbawionego zdolności do metylacji DNA (rozdz. 6.8). Z własnego doświadczenia wiem, że wyznaczenie ilości dwóch białek w celu porównania ich aktywności to zadanie proste jedynie z pozoru. Doktorant zastosował dwa różne podejścia w oszacowaniu aktywności endonukleazowej enzymów – pomiar ilości produktu i pomiar ubytku substratu. Analiza wymagała densytometrycznego oszacowania ilości obydwu badanych białek oraz ilości strawionego i niestrawionego DNA substratowego. Doktorant nie podaje jednak bezkrytycznie specyficznej aktywności restrykcyjnej enzymu zmutowanego, ocenionej wg obliczeń na około 86% aktywności specyficznej enzymu natywnego, ale zwraca uwagę na niedoskonałości stosowanych metod i możliwość wystąpienia błędu skumulowanego. Chciałbym tu jednak przedstawić dwie uwagi. Obliczenie średniej wartości procentowej ubytku substratu na 500 ng enzymu przedstawione w Tab. 8 nie wydaje się

praktyczne, przy ogromnej rozpiętości wyników sięgającej od 48 do 480%. Mam też wątpliwości dotyczące opisu na str. 140-141, z którego wynika, że strawienie 1 μg substratu DNA wymaga użycia dwukrotnie większej ilości enzymu natywnego niż zmutowanego, podczas gdy ostatecznie uznano, że specyficzne aktywności restrykcyjne obu enzymów uznano są zbliżone.

Doktorant potwierdził bezsprzecznie aktywność restrykcyjną białka TspDTI oraz wariantu mutacyjnego APPW i przeprowadził w podobny sposób badanie tej aktywności dwóch innych wariantów mutacyjnych TspDTI: (i) białka pozbawionego domeny TRD2 (ang. target recognition domain) i (ii) TRD2 wraz z domeną CC (ang. coiled-coil). Stwierdzenie o całkowitym pozbawieniu aktywności restrykcyjnej (s. 154) białka TspDTI po usunięciu jednej z dwóch domen potencjalnie zaangażowanych w rozpoznanie substratu wydaje się niedostatecznie uzasadnione. Z zasady bardzo trudno udowodnić całkowity brak aktywności, a wyniki pokazane na Ryc. 53, 54, 56 i 57 nie są całkowicie przekonujące. Pomocna mogłaby tu być dodatkowa kontrola lizatu *E. coli* bez enzymu TspDTI. Jednak lepiej użyć w takim wypadku sformułowania, że aktywności nie wykryto w warunkach oznaczenia, co może wiązać się nie tyle z jej brakiem, ale zaburzeniem lub bardzo niską wartością. Warto byłoby także dodać dyskusję, czy sama domena TRD1 może zapewnić, choćby szczątkową, aktywność restrykcyjną.

Interpretacja wyników jest poprawna i zdecydowana większość wniosków nie budzi wątpliwości. Bardzo ciekawa jest dyskusja dotycząca niezmiernie interesującego spostrzeżenia, że temperatura optymalnej aktywności endonukleazy Bill jest o około 8°C niższa niż optymalna temperatura wzrostu *B. ilicheniformis*. Doktorant rozważa tu jako wyjaśnienie nabycie genu kodującego Bill w drodze horyzontalnego transferu genów od bakterii preferującej niższe temperatury oraz stawia pytanie, czy spadek aktywności Bill w temp. 55°C nie jest elementem mechanizmu, który przyczynia się do łatwiejszej modyfikacji genomu, zapewniając tym samym lepsze możliwości adaptacyjne. Dodałbym tu jednak, że stabilność enzymu *in vitro* może być niższa niż w cytozolu. Ponadto, można rozważyć jeszcze inne wytłumaczenie. W optymalnej temperaturze wzrostu bakterii może brakować czasu na pełną metylację DNA po replikacji i obniżona aktywność restryktazy chroniłaby wtedy DNA przed uszkodzeniem. Opis metod wskazuje, że podczas badania aktywności Bill w różnych temperaturach Doktorant uwzględnił wpływ spadku pH z temperaturą, typowy dla buforów Tris, ale w opisie wyników należałoby to podkreślić. Niezależnie od wyjaśnienia opisanego fenomenu, Doktorant powinien odnieść się tu do stanu wiedzy. Czy podobny efekt obserwowano w wypadku innych endonukleaz restrykcyjnych lub innych enzymów?

Do identyfikacji gatunkowej użytego izolatu bakterii użyto nowoczesnej metody MALDI-TOF, ale warto dodać kilka zdań wyjaśnienia dotyczącego nazwy *Bacillus ilicheniformis*, której nie potrafiłem znaleźć w dostępnej mi w literaturze. Wskazane byłoby także szczegółowe podanie miejsca pobrania próbek gleby, najlepiej z wyszczególnieniem współrzędnych geograficznych.

Wyznaczenie nukleotydowej sekwencji rozpoznania enzymu BclI nie budzi wątpliwości, ale na Ryc. 40 pokazano wynik sekwencjonowania tylko jednej nici trawionego fragmentu DNA, gdzie cięcie zachodzi w odległości 5 nt od sekwencji rozpoznania. Wspomniane jest sekwencjonowanie drugiej nici, jednak tych wyników nie pokazano i nie omówiono. Doktorant określa zakres stężeń użytych żeli agarozowych i poliakrylamidowych w rozdziale „Metody”, ale nie podaje poszczególnych wartości dla żeli pokazanych w wynikach. Warto byłoby dodać jakie znaczenie dla aplikacji biotechnologicznych BclI mogą mieć optima pH i temperatury wyższe odpowiednio o 1 punkt i 10°C niż dla jego izoschimeru BsaI.

Doktorant w sposób przejrzysty i precyzyjny opisuje eksperymenty i wyniki swojej pracy oraz prawidłowo posługuje się terminologią naukową. Poza pewną liczbą błędów typograficznych i interpunkcyjnych występuje w pracy kilka usterek edytorskich: pleonazm „N terminalny koniec” (s. 16), stosowanie dość powszechnej, ale wg kryteriów nomenklatury chemicznej nieprawidłowej formy „akrylamidowy”, zamiast „akryloamidowy”, „na żelu” zamiast „w żelu” w odniesieniu do rozdziału elektroforetycznego DNA i białek, „min.” (z kropką) zamiast „min” (bez kropki) i wymienne użycie form „godzina”, „godz.” lub „h”.

Język pracy nie budzi ogólnych zastrzeżeń, ale pojawia się kilka skrótów myślowych i nietrafnych wyrażań, które wymagałyby korekty:

- określenie, że w przypadku tępych końców DNA „żaden z jednoniciowych fragmentów nie jest dłuższy od drugiego” (s. 20), co odpowiada raczej opisowi struktury tzw. „widełek” w DNA niż tępym końcom;
- „wyniki analizy białkowej” s. 126 w odniesieniu od wyników elektroforezy PAGE;
- „wykryto niewielką ekspresję białka na wysokości odpowiadającej wielkości 112,8 kDa” (s. 130), gdy faktycznie chodzi o prążek w żelu reprezentujący białko produkowane w komórkach;
- „brak aktywności w lizacie bakteryjnym białka TspDTI” (s. 137) zamiast „brak aktywności restrykcyjnej w lizacie bakteryjnym białka TspDTI”;
- „bufor metylujący” s. 144 zamiast „bufor do metylacji DNA”.

Należy jednak podkreślić, że w skali pracy te uchybienia nie mają istotnego znaczenia, nawet jeśli ich opis, z konieczności, wymaga sporo miejsca. Uwypuklić należy natomiast atuty pracy Roberta M. Boratyńskiego, czyli szeroki zakres stosowanych metod biologii molekularnej, rzetelna dokumentacja doświadczeń, staranne i precyzyjne opisy doświadczeń oraz wyników, ogromny nakład pracy eksperymentalnej przedstawiony w rozprawie, ale wniesiony też niewątpliwie do publikacji spoza rozprawy.

Dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 8 doniesień konferencyjnych, udział w dwóch grantach MNiSW oraz trzy publikacje z listy filadelfijskiej, dotyczące tematyki enzymów restrykcyjnych i naprawy DNA. Prace te nie wiążą się bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej i R. M. Boratyński nie jest w żadnym z tych artykułów pierwszym albo korespondującym autorem. Stanowią one jednak bardzo wartościowy

wynik publikacyjny świadczący o zaangażowaniu doktoranta w różnych projektach naukowych, a można z pewnością liczyć na to, że cenne wyniki zawarte w omawianej rozprawie wejdą w skład kolejnej publikacji.

Praca mgr Roberta M. Boratyńskiego zawiera istotne elementy nowości naukowej dotyczące odkrycia i charakterystyki endonukleazy restrykcyjnej Bill oraz charakterystyki enzymu TspDTI poszerzające wiedzę o tym niezwykłym białku posiadającym dwie różne domeny odpowiadające za metylację DNA i aktywność endonukleazową. Obserwacja, że aktywność endonukleazowa Bill dramatycznie spada w temperaturze optymalnego wzrostu gospodarza, *B. ilicheniformis*, jest bardzo interesująca i może stanowić punkt wyjścia do głębszego zrozumienia roli biologicznej i sposobu funkcjonowania enzymów restrykcyjnych.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr Roberta Michała Boratyńskiego zatytułowana „Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Roberta Michała Boratyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

