



Dr hab. n. med. Michał Pikula
Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski, Katedra Immunologii
Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk, bud. nr 27
tel. 58 349 1592, fax. 58 349 1591
E-mail: pikula@gumed.edu.pl

Gdańsk, 16.09.2016

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Olgi Żołnierkiewicz pt. „Chemiczna synteza zoptymalizowanego genu *taqIIRM*: otrzymywanie aktywnego biologicznie bifunkcyjnego białka oraz kontrolowana zmiana specyficzności enzymatycznej, sterowana analogami kofaktora” napisanej pod kierunkiem promotora Pana prof. dra hab. Piotra Skowrona oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. Agnieszki Żylicz-Stachula. Recenzja opracowana na zlecenie Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Z przyjemnością i dużym zainteresowaniem zapoznałem się z rozprawą doktorską Pani mgr Olgi Żołnierkiewicz. Już na wstępie chcę podkreślić jej wysoką wartość zarówno merytoryczną, metodologiczną, jak również aplikacyjną. Podjęty temat wpisuje się w nurt badań nad złożoną problematyką inżynierii genetycznej, syntezy oraz analiz biochemicznych białek pochodzenia bakteryjnego. Wszystkie te obszary są aktualnie ważnym elementem rozwoju nauk chemicznych i biomedycznych. Recenzowana praca stanowi część badań prowadzonych od wielu lat w Katedrze Biotechnologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, kierowanej przez prof. dra hab. Piotra Skowrona.

Recenzowaną pracę stanowi przygotowane w języku polskim opracowanie liczące 187 stron. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich z zakresu nauk eksperymentalnych i nie budzi zastrzeżeń. Praca zawiera następujące części: „cele”, „streszczenie”, „wprowadzenie”, „materiały”, „metody”, „wyniki”, „dyskusja wyników” oraz „podsumowanie”. Pracę uzupełnia wykaz skrótów, spis tabel i rysunków oraz literatura obejmująca 255 pozycje wraz z wykazem stron internetowych (11 odnośników). Rozprawa doktorska przygotowana jest starannie i przejrzyście. Posiada dobrze dopracowaną stronę graficzną, klarowne ryciny, tabele i wykresy. Układ pracy pokazuje duże umiejętności Doktorantki w zakresie właściwego przedstawienia problemu naukowego i poprawnego sposobu jego rozwiązania oraz odpowiedniej analizy wyników.



Wprowadzenie stanowi bardzo dokładny i obszerny opis podjętej tematyki badawczej. W liczącym 24 strony wprowadzeniu Autorka opisała charakterystykę organizmów ciepłolubnych oraz ich adaptację do życia w wysokiej temperaturze, systemy restrykcyjno-modyfikujące (RM), jak również enzymy z rodziny *Thermus* sp. Autorka opisała również szczegółowo projektowanie i chemiczną syntezę DNA *de novo*. Na uwagę zasługuje umieszczenie szczegółowych tabel, które systematyzują wiedzę dotyczącą klasyfikacji organizmów ekstromofilnych, termofilnych oraz systemów restrykcyjno-modyfikujących (RM). Autorka pracy przy zastosowaniu tabel i dobrej jakości rysunków przedstawiła również pełną charakterystykę porównawczą enzymów z rodziny *Thermus* sp. Ciekawym i ważnym elementem wprowadzenia pracy jest opisanie procesu ewolucji systemów RM, który prowadził do ich dużej zmienności genetycznej i funkcjonalnej. We wprowadzeniu Autorka pracy podkreśliła kluczowy laboratoryjny problem niskiego poziomu ekspresji genów kodujących termostabilne endonukleazo-metylotransferazy (RM), dzięki czemu w logiczny sposób wyjaśniła zasadność podjętego przez siebie tematu badawczego. Doktorantka, przygotowując tę część pracy, wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu i bieżącego piśmiennictwa naukowego.

Autorka pracy w sposób precyzyjny ustaliła dwa główne cele badawcze. Pierwszym zamierzeniem było zbadanie biochemicznych właściwości rekombinantowej REazy TaqII, w tym ustalenie warunków maksymalnej aktywności enzymu, weryfikacja i wyznaczenie sekwencji rozpoznawanych oraz miejsc cięcia DNA. Drugim celem była optymalizacja procedury nadprodukcji białka TaqII w bakterii *E. coli* oraz opracowanie protokołu izolowania aktywnego enzymu. Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, iż temat pracy doktorskiej obejmuje również chemiczną syntezę genu *taqIIRM*, co nie zostało wyszczególnione w celach pracy. Dodatkowo, pozwolę sobie zauważyć, iż cele opisane są łącznie z założeniami pracy, co w mojej opinii powinno zostać rozdzielone dla poprawienia czytelności pracy.

W rozdziale „materiały” Autorka starannie i szczegółowo przygotowała wykaz użytego materiału biologicznego (szczepy bakteryjne) i genetycznego (DNA bakteriofagów, bakterii oraz hepatocytów), materiałów do hodowli bakteryjnych, odczynników i enzymów do pracy z kwasami nukleinowymi oraz sprzętu laboratoryjnego i komputerowego. W opisywanym



rozdziale Autorka przedstawiła również czytelne mapy restrykcyjne plazmidów oraz porównanie sekwencji syntetycznego oraz natywnego genu *taqIIRM*. Rozdział ten nie budzi zastrzeżeń Recenzenta. W dalszej części pracy Doktorantka wyczerpująco przedstawiła zastosowane metody badawcze. W rozdziale tym zostały opisane metody służące otrzymywaniu syntetycznego genu *taqIIRM^{syn}* oraz techniki nadprodukcji i analizy enzymu TaqII^{syn}. Autorka nie przedstawiła jednak informacji na temat pochodzenia tkanek zwierzęcych (wątroby). Czy były to tkanki dostępne komercyjnie? Z jakiej liczby zwierząt? Zastrzeżenia może budzić stwierdzenie, iż w wyniku homogenizacji wątroby uzyskano DNA hepatocytów. Należy zwrócić uwagę, że organ ten zawiera, obok hepatocytów, szereg innych komórek, np. komórki śródbłonna, makrofagi. W rozdziale „wyniki”, jak również w całej pracy, Autorka często stosuje określenie „optymalizacja genu”, co jest pewnym uproszczeniem wynikającym z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego. Określenie to, w opinii Recenzenta powinno być jednak uszczegółowione dla jednoznaczności opisu tego procesu. Metodyka pracy została podzielona według materiału badawczego, który wykorzystywano w pracy, co jest często stosowanym zabiegiem. Może to jednak nastroczać czytelnikowi pewne trudności w pełnym prześledzeniu szlaku eksperymentalnego i odniesieniu go do wyników. W opinii Recenzenta, umieszczenie w pracy schematu (sekwencji) procedur mogłoby znacznie ułatwić prześledzenie wszystkich technik i interpretację wyników. Należy również dodać, iż gen *taqII* został zsyntezowany przez firmę zewnętrzną, która zgodnie z opisem Doktorantki, nie udostępniła informacji na temat techniki syntezy. Doktorantka podjęła się jednak objaśnienia procesu syntezy tego genu w oparciu o powszechnie dostępne publikacje i protokoły. Synteza genu przez firmę zewnętrzną, jak również ogólny jej opis nie budzą zastrzeżeń. Jednak w związku z powyższym, tytuł pracy w mojej opinii nie powinien odnosić się do syntezy genu *taqIIRM*. Ponadto w rozdziale „metody” (strona 72) brakuje opisu systemu numerowania i informacji o całkowitej liczbie otrzymanych rekombinantów, z których część wyszczególniona jest w rozdziale „wyniki”. Natomiast pewne opisy są powtarzane np. etapy klonowania genów. Umieszczenie tych opisów w jednym miejscu sprawiłoby, że opis procedury byłby znacznie czytelniejszy.

W następnym rozdziale „wyniki” Autorka przedstawiła bardzo dokładnie biochemiczne właściwości rekombinantowej endonukleazy TaqII, klonowanie syntetycznego genu *taqIIRM*,



optymalizację nadprodukcji i izolacji enzymu TaqII. Autorka przedstawia w tym rozdziale wyniki szeregu dobrze zaplanowanych doświadczeń, które wykonane były z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej. Jednocześnie należy w tym miejscu podkreślić ogromny wkład pracy laboratoryjnej Doktorantki. Warte zaznaczenia jest umieszczenie w rozdziale „wyniki” dokładnych tabel, dobrej jakości rysunków, zdjęć oraz schematów. Duża liczba wysokiej jakości zdjęć zeli elektroforetycznych znakomicie dokumentuje wykonane przez Doktorantkę doświadczenia. Moje zastrzeżenie budzi jednak część wyników, która przedstawia dane liczbowe (% aktywności enzymu), pochodzące tylko z pojedynczych doświadczeń. Dotyczy to np. wpływu wartości pH oraz siły jonowej na aktywność REazy TaqII (strony 93, 94). Brak powtórzeń powoduje, iż trudno wyznaczyć z dużą dokładnością rzeczywisty wpływ niektórych parametrów na aktywność enzymu. W mojej opinii rozdział „wyniki” zawiera w niektórych miejscach zbyt dużo szczegółów opisanych wcześniej w rozdziale „metody”. Zrezygnowanie z części tych opisów ułatwiłoby czytelnikowi płynniejsze zapoznanie się z wynikami. Dodatkowo, ze względu na bardzo rozbudowaną i szczegółową część poświęconą wynikom, sugerowałbym umieszczanie podsumowania podrozdziałów, co w znaczącym stopniu ułatwiłoby czytelnikowi zapoznanie się z pracą. Kolejność omawianych wyników odpowiada celom pracy, jednak nie znajduje ona swojego odzwierciedlenia w opisanym w metodzie i sekwencji wykonywanych procedur eksperymentalnych. Przykładowo, wyniki rozpoczynają się od omówienia własności biochemicznych białka a nie syntezy genu. Mimo tych uwag, całość rozdziału „wyniki” reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i stanowi niezwykle wartościową podstawę do tworzenia dyskusji i wyciągania wniosków.

W następnym rozdziale „dyskusja wyników” Autorka w sposób wnikliwy omówiła wyniki pracy dotyczące różnorodności aktywności REazy, specyficzności substratowej enzymu TaqII oraz ekspresji genu *taqIIRM*. Ciekawym elementem tego rozdziału jest tabela, która bardzo dokładnie opisuje i klasyfikuje mechanizmy molekularne warunkujące termostabilność białek. W rozdziale tym zwraca uwagę dojrzałość naukowa Doktorantki oraz umiejętność analizy i wnioskowania naukowego. Na końcu rozdziału znajduje się dość krótkie odniesienie do mutagenyzy genu *taqIIRM*. Proces ten wydaje się być bardzo ciekawy i w mojej opinii zasługuje na nieco szerszy opis.



W „podsumowaniu” Autorka opisała najważniejsze wyniki pracy skupiając się na właściwościach biochemicznych REazy TaqII oraz warunkach chemicznych tworzących optymalną aktywność tego enzymu. Autorka podkreśla również, iż opracowana technologia może być użyteczna w tworzeniu i konstruowaniu bibliotek genomowych. Doktorantka wymienia również, spośród najważniejszych wyników, zoptymalizowanie procedury nadprodukcji toksycznego dla rekombinantowego, mezofilnego gospodarza *E. coli* białka TaqII. Rozdział „podsumowanie” nie budzi zastrzeżeń i dowodzi umiejętności syntezy oraz interpretacji wyników przez Panią mgr Żołnierkiewicz. W mojej opinii warto byłoby jednak przedstawić także bardziej ogólne wnioski płynące z prac eksperymentalnych i podsumowania wyników.

W dalszej części pracy Doktorantka przedstawiła wykaz skrótów, spis 61 tabel, 24 rysunków, 11 wykresów, 2 równań, 30 obrazów elektroforez oraz 2 fluorogramów. Wykazy te zostały przygotowane z należytą starannością i nie budzą zastrzeżeń. Ostatnią częścią pracy jest literatura licząca 255 pozycji bibliograficznych oraz 11 odnośników do stron internetowych. Dobór piśmiennictwa przygotowany jest starannie i nie budzi zastrzeżeń. Wykorzystanie tak bogatej i szerokiej literatury pokazuje, iż Autorka rozprawy swobodnie porusza się w obszarze prowadzonych badań naukowych. Należy jednak zaznaczyć, iż znaczna część cytowanych prac została opublikowana ponad 10 lat temu.

Cała praca napisana jest starannie i reprezentuje bardzo wysoki poziom edytorski. Mimo to, Autorka w kilku miejscach pracy popełniła niewielkie błędy pisząc np. „wyciszała transkrypcję białka” (strona 29) lub „z pośród” (strona 123). Omyłki te nie wpływają jednak na ogólny obraz pracy i przy tak wysokim poziomie rozprawy doktorskiej nie mają dużego znaczenia.

Podsumowując, chciałbym podkreślić wysoki poziom naukowy recenzowanej rozprawy doktorskiej, a szczególnie poruszenie ciekawego problemu naukowego, precyzyjnie wykonane i opisane doświadczenia oraz dojrzałą dyskusję. Jednocześnie chciałbym podkreślić, iż Autorka włożyła ogromny wkład pracy laboratoryjnej by uzyskać zaprezentowane wyniki. Co ważne, większość z tych wyników spotkało się z dużym zainteresowaniem i dobrym przyjęciem przez świat naukowy, czego dowodem są publikacje Autorki w pismach o wysokim wskaźniku oddziaływania, np. *BMC Genomics*. Doktorantka przedstawiła wykaz 7 publikacji dotyczących



przede wszystkim tematyki recenzowanej pracy, jak również badania endonukleaz oraz genetyki owadów. W sześciu publikacjach Doktorantka była drugim autorem, a w jednej autorem czwartym. Doktorantka przedstawiała również swoje wyniki prac na konferencjach w Polsce i za granicą. Wszystko to świadczy o dużej aktywności naukowej Doktorantki oraz znaczącej roli w opublikowanych pracach eksperymentalnych. Wyniki uzyskane z prowadzonych badań pozwoliły na ustalenie nowego protokołu nadprodukcji termostabilnego białka TaqII. Badania te przyczyniły się również do lepszego poznania białek TaqII na poziomie biochemicznym. Przedstawione w pracy metody mogą stanowić bardzo istotne narzędzie do analizy funkcjonalnej i strukturalnej białek enzymatycznych różnorodnego pochodzenia. Ponadto opracowane protokoły mogą ułatwić produkcję, na skalę półprzemysłową, dowolnie wybranych białek. Prowadzą one również do uzyskania efektywnego narzędzia biotechnologii molekularnej, mającego potencjalne zastosowania praktyczne. W związku z powyższym uważam, iż recenzowana praca doktorska zasługuje na wyróżnienie. Biorąc jednak pod uwagę kryteria wyróżniania prac doktorskich obowiązujące na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego postawienie przez Recenzenta wniosku formalnego o wyróżnienie jest nieuzasadnione.

Podsumowując stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Olgi Żołnierkiewicz pt. „Chemiczna synteza zoptymalizowanego genu *taqIIRM*: otrzymywanie aktywnego biologicznie bifunkcyjnego białka oraz kontrolowana zmiana specyficzności enzymatycznej, sterowana analogami kofaktora” spełnia ustawowe oraz zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Olgi Żołnierkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Michał Piłkuła