



**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Darii Krefft**

**pt. „Bifunkcyjna endonukleaza restrykcyjna TthHB27I: analiza właściwości
oraz zwielokrotnienie biosyntezy enzymu poddanego inżynierii chemicznej kodującego genu”**

Endonukleazy restrykcyjne są podstawowym narzędziem biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. Pod względem użytkowym szczególnie cenne w tej grupie są enzymy termostabilne, ponieważ wykazują aktywność w podwyższonych temperaturach stosowanych w wielu procesach przemysłowych, a także mają większą tolerancję na niekorzystne czynniki w środowisku reakcji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest twórczą kontynuacją nurtu badawczego prowadzonego od wielu lat przez zespół Prof. dr hab. Piotra Skowrona, promotora pracy.

Do recenzji dostarczono rozprawę doktorską liczącą 186 stron łącznie z wykazem piśmiennictwa. Układ pracy jest standardowy, przy czym opis celu umieszczono na początku przed wstępem teoretycznym, a wyniki połączono z dyskusją. Taki układ jest spotykany w publikacjach naukowych i jak najbardziej dopuszczalny. Od strony redakcyjnej praca została przygotowana bardzo starannie, jedynie z drobnymi uchybieniami, które nie miały wpływu na ocenę rozprawy. Uchybieniem utrudniającym nieznacznie odbiór tekstu są niekompletne legendy niektórych rycin i tabel. Wprawdzie większość rycin i tabel została przedstawiona w prosty sposób, w ogóle niewymagający dodatkowych wyjaśnień w legendach, ale niepełne legendy np. Tab. 5 (brak definicji oznaczonych fragmentów sekwencji), Rys. 46 (brak definicji T_0), Tab. 21 (brak rozwinięcia skrótów nazw buforów i ich składu, brak definicji $T_m(1)$ i $T_m(2)$) powodują konieczność odwołań do głównego tekstu dla pełnego zrozumienia tych elementów. Ponadto, na stronie 19, przy omówieniu replikonu, doszło do przejęzyczenia („miejsce inicjacji translacji” zamiast „miejsce inicjacji replikacji”).

Do badań wybrano endonukleazo-metylotransferazę (REazo-MTazę) z rodziny Thermus – TthHB27I. Podstawą tego wyboru była jak dotąd znikoma ilość informacji dotycząca tego enzymu, ograniczona do danych *in silico* wskazujących na istnienie genu kodującego tę REazo-MTazę, stąd praca jest niewątpliwie pionierska. Poznanie właściwości biochemicznych i fizykochemicznych TthHB27I było niezbędne do oceny potencjału użytkowego tego enzymu. Z kolei wykorzystanie tego potencjału wymagało optymalizacji biosyntezy aktywnego enzymu. Te dwa aspekty stanowią główne cele pracy, uzupełnione o kilka celów szczegółowych. Stąd, praca

ma charakter wielowątkowy, wyznaczone cele są bardzo ambitne, a do ich realizacji konieczna była biegła znajomość zaawansowanych technik z zakresu biotechnologii molekularnej.

Wstęp teoretyczny został przejrzysto napisany, stanowi logiczny ciąg myślowy i mógłby być podstawą materiałów dydaktycznych dla studentów. Ta część rozprawy jest mocno rozbudowana, ponieważ zajmuje 46 stron, ale jest to w pełni uzasadnione wspomnianym wcześniej wielowątkowym charakterem pracy. Doktorantka wyczerpująco przedstawia metody nadprodukcji białek rekombinowanych, ze szczególnym uwzględnieniem systemów prokariotycznych stosowanych podczas realizacji projektu doktorskiego, dokonuje również krytycznej analizy wad i zalet współcześnie stosowanych systemów ekspresyjnych. Opisane zostały również cechy genów, które należy uwzględnić w trakcie projektowania nadprodukcji białka rekombinowanego. Doktorantka w pełni skorzystała z tej wiedzy podczas wykonania praktycznej części projektu doktorskiego. W dalszej części została przedstawiona ogólna klasyfikacja i charakterystyka systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych (R-M), a bardziej szczegółowo charakterystyka enzymów termostabilnych należących do rodziny *Thermus*. Bardzo interesujące, a jednocześnie inspirujące jest przedstawienie systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych w kontekście ewolucyjnym, z uwzględnieniem teorii genów samolubnych (ang. *selfish genes*), prowadzące do hipotezy, że systemy R-M mogą reprezentować minimalną, prymitywną formę życia, analogicznie do np. wirusów lub transpozonów. Nawiązanie do teorii genów samolubnych jest również kontynuowane w omówieniu wyników w dalszej części pracy. Ponadto, tekst uzupełniony jest dobrze skomponowanymi rycinami. Jediną uwagę, jaką mam do wstępu jest moim zdaniem zbyt częste cytowanie prac przeglądowych zamiast odniesień do klasycznych raportów badawczych.

Cześć metodyczna rozprawy została przygotowana bardzo starannie i szczegółowo. Jedyne w opisie optymalizacji genu *tthHB27IRM* (rozdział 4.12) przydałoby się więcej szczegółów. To istotna część pracy wymagająca znajomości zaawansowanych metod. To również jeden z głównych celów pracy. Więcej informacji na temat optymalizacji genu *tthHB27IRM* znajduje się jednak w omówieniu wyników, które niweluje negatywny wydźwięk powyższego komentarza. Dodatkowo, bardziej złożone procedury laboratoryjne mogłyby zostać przedstawione w postaci wypunktowanej listy, która ułatwiłaby korzystanie z opisanych metod w kolejnych projektach. Ta uwaga wyraża jedynie moją osobistą preferencję. Ogólnie, opis materiałów i metod przekracza standard spotykany w zbliżonych tematycznie pracach, a to oceniam bardzo wysoko.

Wyniki pracy zostały zaprezentowane rzeczowo i stanowią spójny logiczny ciąg myślowy. Interpretacja wyników zasadniczo jest poprawna. Wysoko oceniam wytrwałość doktorantki i biegłość warsztatową. Podczas oceny właściwości fizykochemicznych endonukleazometylotransferazy TthHB27I doktorantka dokonała krytycznej analizy dostępnych rozwiązań technicznych i wybrała kombinację stosunkowo prostych standardowych metod, zamiast NMR i krystalografii, których wykorzystanie do analizy REaz i MTaz jest trudne i w konsekwencji niepraktyczne. To świadczy o dojrzałości naukowej doktorantki.

Pomimo trudności z uzyskaniem wydajnej ekspresji natywnego genu *wt-tthHB27IRM*, doktorantka podjęła trudne wyzwanie, zaprojektowała i podjęła udaną próbę optymalizacji, klonowania i ekspresji syntetycznego genu *syn-tthHB27IRM*. Ostatecznie uzyskała rekombinowaną REazę *syn-TthHB27I* wykazującą wyraźny wzrost aktywności w przypadku obecności efektora allosterycznego SAM w środowisku reakcji, wyższy niż w przypadku natywnego enzymu.

Mam trzy ogólne uwagi do tej części pracy. Wyniki zawierają za dużo aspektów metodycznych i technicznych. Krótkie podsumowanie metod nie jest przeciwwskazane przy omówieniu wyników, w szczególności, jeśli dotyczy nowatorskich, autorskich metod, lub jest konieczne dla zrozumienia przedstawionych wyników. Jednak opis dotyczący standardowych metod jest zbyt szczegółowy i większość podanych informacji powinna być znaleźć się w Materiałach i Metodach. Informacje takie jak objętości użytych roztworów, czy parametry wirowania są zbędne przy omawianiu wyników doświadczeń. Tym niemniej, doktorantka konsekwentnie stosowała ten sam układ tekstu w poszczególnych podrozdziałach, w których opis metodyczny następował przed właściwymi wynikami i krótką, ale w zupełności wystarczającą dyskusją. Dlatego odnalezienie w tekście istotnych informacji nie było problematyczne.

Druga uwaga dotyczy elektroforegramów. Interpretacja obrazów żeli elektroforetycznych jest zasadniczo poprawna, ponieważ różnice ilościowe w większości przypadków nie pozostawiają wątpliwości i są widoczne „gołym okiem”. Tym niemniej, wskazana byłaby przynajmniej przybliżona ocena półilościowa, możliwa do osiągnięcia z użyciem publicznie dostępnych programów. Zniwelowałyby to możliwy wpływ subiektywnej oceny żeli elektroforetycznych na ostateczną interpretację wyników. Ponadto, przydałaby się kontrola naniesień i normalizacja wyników względem np. wzorca wielkości lub nietrawionego produktu PCR stanowiącego substrat dla enzymu *TthHB27I*. Doktorantka z resztą wykonała analizę densytometryczną w doświadczeniu opisanym w punkcie 5.5.2. Stąd proszę o wyjaśnienie, dlaczego analogiczna metoda nie została użyta w pozostałych doświadczeniach, zarówno tych dotyczących białek, jak i DNA?

Ponadto, w przypadku prezentacji wyników obejmujących aktywność endonukleolityczną *TthHB27I*, dla porównania wskazane byłoby umieszczenie na rycinach osobnego panelu z teoretycznym (*in silico*) obrazem wzoru trawienia.

Mam również dwie uwagi szczegółowe. Odnośnie danych przedstawionych na Rys. 16 (s. 107) uważam, że interpretacja wyniku doświadczenia nie jest w pełni prawidłowa. Należałoby omówić różnice w stosunku do kontroli w przypadku reakcji z Ca^{2+} i EDTA. Układ prążków w żelu wskazuje na częściową aktywność enzymatyczną, także w przypadku obecności jonów Ca^{2+} . Od strony metodycznej, po uzyskaniu takiego wyniku wskazana byłaby ocena wpływu jonów Ca^{2+} oraz EDTA w szerszym zakresie stężeń, a nie tylko w jednym, arbitralnie wybranym stężeniu.

Na stronie 165 doktorantka posługuje się określeniem „korelacja”, podczas gdy w kontekście tego akapitu bardziej właściwe byłoby użycie słowa „powiązanie”.

Ostatnią częścią rozprawy jest „podsumowanie”, które nie zawiera typowych wniosków, ale jest to uzasadnione, ze względu na głównie obserwacyjno – opisowy charakter pracy. W związku z tą częścią pracy mam kolejne pytanie. Doktorantka równolegle opracowała dwa sposoby na zwielokrotnienie biosyntezy aktywnego białka TthHB271, tj. w oparciu o ekspresję w pełni syntetycznego genu *syn-tthHB271RM*, lub koekspresję natywnego genu *TthHB271* z genami kodującymi białka opiekuńcze. Czy podjęto próbę połączenia tych dwóch rozwiązań w jednym układzie doświadczalnym?

Praca jest bardzo bogata warsztatowo. Wielokierunkowość strategii badawczej, oraz powiązana mnogość zastosowanych rozwiązań metodycznych jest wyróżniająca, a weryfikacja i powiązanie wyników badań fizykochemicznych uzyskanych różnymi metodami potwierdza całościowo wiarygodność uzyskanych danych. Wyniki mają duży potencjał aplikacyjny, a jednocześnie rozprawa posiada aspekty dotyczące podstawowych problemów nauki, w tym istoty życia jako takiego, w kontekście teorii genów samolubnych (ang. *selfish genes*). Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki badań zostały również opublikowane w bardzo dobrych specjalistycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania. Doktorantka jest pierwszym autorem trzech z pięciu publikacji, a także współautorem przyznanego patentu oraz innego zgłoszenia patentowego.

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że zostały spełnione wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Darii Krefft do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoką jakość przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, jak również powiązanych publikacji, wnioskuję o wyróżnienie doktoratu Darii Krefft.



dr hab. Arkadiusz Piotrowski, prof. nadzw. GUMed

Gdańsk, 28 sierpnia 2018 roku