



POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. inż. Paweł Sachadyn, prof. nadzw. PG

Pracownia Biotechnologii Regeneracyjnej

Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

email: psach@pg.edu.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 10 września 2018

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr Darii Krefft pt. „Bifunkcyjna endonukleaza restrykcyjna TthHB27I: analiza właściwości oraz zwielokrotnienie biosyntezy enzymu poddanego inżynierii chemicznej kodującego genu”

Rozprawa doktorska Doktorskiej mgr Darii Krefft zatytułowana „Bifunkcyjna endonukleaza restrykcyjna TthHB27I: analiza właściwości oraz zwielokrotnienie biosyntezy enzymu poddanego inżynierii chemicznej kodującego genu” wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora prof. Piotra Skowrona i promotora pomocniczego dr. hab. Agnieszki Żylicz-Stachuli przedstawia wyniki badań nad biotechnologicznym otrzymywaniem i właściwościami endonukleazo-metylotransferazy TthHB27I z *Thermus thermophilus*. Jest to kolejna praca z serii badań poświęconych enzymom restrykcyjnym z bakterii *Thermus*, które z sukcesem prowadzone są w przez zespół naukowy Katedry Biotechnologii Molekularnej UG.

Celem pracy były opracowanie metody otrzymywania i charakterystyka endonukleazo-metylotransferazy TthHB27I z termofilnej bakterii *Thermus thermophilus* HB27, izoschizomeru enzymu Tth111II ze szczepu *T. thermophilus* 111II. Doktorantka wykonała postawione zadania przeprowadzając szereg pracochłonnych eksperymentów i korzystając z bogatego asortymentu technik biologii molekularnej. Bardzo szeroki zakres badań objął otrzymywanie enzymu z naturalnego gospodarza i badanie jego właściwości biochemicznych, klonowanie genu natywnego i jego ekspresja w *Escherichia coli* w obecności

białek chaperonowych, klonowanie syntetycznej wersji genu kodującego TthHB271 oraz otrzymywanie i badanie aktywności białka kodowanego przez syntetyczny gen, a także analizy fizykochemiczne.

Rozprawa doktorska mgr Darii Krefft liczy 186 stron, na które składają się: spis treści, wykaz skrótów cel pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp teoretyczny (46 stron), materiały i metody (39 stron), wyniki i dyskusja (68 stron), podsumowanie i literatura. W manuskrypcie umieszczono 51 rycin i 21 tabel.

Wstęp teoretyczny zawiera trzy części, które odnoszą się do tematyki rozprawy: metody nadprodukcji białek rekombinowanych, klasyfikacja systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych i charakterystyka termostabilnych endonukleazo-metylotransferaz z rodziny *Thermus*. Rozdział ten pokazuje szeroką wiedzę i świetną orientację Doktorantki w zakresie najnowszych osiągnięć biotechnologii molekularnej. W mojej ocenie szczególnie wart uwagi jest podrozdział dotyczący bezkomórkowej produkcji białek. W odniesieniu do systemów ekspresji białek rekombinowanych w komórkach ssaków, warto podkreślić, że jest to obecnie wiodące rozwiązanie w komercyjnej produkcji białek farmaceutycznych.

Rozdział „Materiały i metody” przedstawia starannie sporządzony wykaz i opis użytych materiałów, instrumentów oraz metod eksperymentalnych. Dobór i opis metodyki nie budzą zastrzeżeń, a jej zakres obejmuje nie tylko techniki biologii molekularnej, ale też nowoczesne metody fizykochemiczne i wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych. Warto docenić pomysłowości Doktorantki, która pomiary różnicowej fluorymetrii skaningowej wykonała podczas szkolenia organizowanego przez producenta sprzętu. W tak szczegółowym opisie metodologii nie znalazłem jedynie specyfikacji aparatury chromatograficznej użytej do oczyszczania białek.

O ile wstęp i metody są bardzo dobrze przygotowane, rozdział „Wyniki i dyskusja” oddaje nieprzeciętny kunszt laboratoryjny Doktorantki oraz umiejętność zaprojektowania eksperymentów, przedstawienia wyników i ich interpretacji. Duże wrażenie robią perfekcyjnie wykonane elektroforezy i fotografie żeli elektroforetycznych. Jak wcześniej wspomniałem, zakres wykonanych prac jest bardzo szeroki i nie ogranicza się tylko do eksperymentów molekularnych, ale zawiera też bioinformatyczną optymalizację sekwencji nukleotydowej genu. Ponieważ trudno w tym rozdziale znaleźć niedociągnięcia, za wyjątkiem braku na Rys. 47 ścieżki oznaczonej w legendzie jako „K”, skupię się na kilku, szczególnie wartych odnotowania, elementach. Warto podkreślić, że zadanie p. Darii Krefft było niełatwe, ponieważ pracowała z białkiem o rozmiarze 117 kDa, czyli, jak na system prokariotyczny, bardzo dużym. Dzięki efektywnej współpracy z kilkoma laboratoriami zewnętrznymi Doktorantka przygotowała analizy fizykochemiczne z użyciem spektrometrii mas, różnicowej kalorymetrii skaningowej i różnicowej fluorymetrii skaningowej, a umiejętność współdziałania z innymi zespołami jest w badaniach naukowych umiejętnością niezwykle cenną. Bardzo przydatny jest też stosowany przez Doktorantkę pomysł nanoszenia na żel objętości lizatu komórkowego proporcjonalnej do gęstości optycznej hodowli, co ułatwia ocenę poziomu ekspresji białka

heterologicznego. Wobec rozmiaru pracy zrozumiałe jest, że Doktorantka powołuje się niekiedy na wyniki, które nie są ujęte w rozprawie, jak np. niską aktywność i termolabilność białka rec-TthHB271 (s. 149). W takim wypadku należy dodać komentarz „wynik nie pokazany”, a najlepiej, odsyłać do innego źródła.

Obszerna bibliografia licząca 204 pozycje jest sporządzona prawidłowo, ale w wypadku cytowanych prac magisterskich warto dodać nazwisko promotora oraz nazwę jednostki, w której została wykonana.

Poprawność językowa i terminologiczna rozprawy p. Darii Krefft nie budzą istotnych zastrzeżeń. Korzystne byłoby jednak stosowanie skrótu „min” zamiast „minuta”, zapis oznaczenia przyspieszenia ziemskiego „g” drukiem pochyłym oraz użycie skrótu „obr./min” w miejsce angielskiego „rpm”. Kilka drobnych potknięć językowych wymienionych niżej nie zmienia mojej opinii, że poziom edytorski rozprawy jest znakomity.

s. 17, „jedną z głównych cech jest fakt” – fakt nie jest cechą;

s. 35, „wiele szczepionek i produktowych bioterapeutycznych ... musi być produkowane”;

s. 40, Decydując się na syntezę genów *de novo* istnieje możliwość” - jest tu pomieszanie trybów;

s. 76, elektroforeza agarozowa – zamiast „elektroforeza w żelu agarozowym”;

s. 101-102, oczyszczanie na złożu dietyloaminocelulozie, fosfocelulozie, heparyno-agarozy zamiast odpowiednio dietyloaminocelulozom, fosfocelulozowym, heparyno-agarozowym;

s. 109, „ustawiono szereg reakcji trawienia” – zamiast np. przygotowano;

s. 119, „uznano za wstępnie pozytywne”;

s. 119, „prawidłową sekwencję na całej długości genu”;

s. 133, „DNA oczyszczono na komercyjnie dostępnym zestawie”.

Na uznanie zasługują osiągnięcia publikacyjne Doktorantki obejmujące 5 publikacji z listy JCR, w tym 3 z pierwszym autorstwem dotyczące przedmiotu rozprawy oraz udział w kilkunastu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych i 7 projektach grantowych, w tym w 4 jako kierownik. W szczególności należy docenić współautorstwo artykułu w prestiżowym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*.

Doskonale przygotowana rozprawa doktorska p. Darii Krefft nie daje większych możliwości podniesienia uwag krytycznych. Myślę jednak, że warto byłoby omówić następujące zagadnienia:

- 1) Jakie są najważniejsze różnice między izoschizomerami TthHB27I i TTh111II i czy można je powiązać z różnicami pomiędzy szczepami *T. thermophilus*, z których pochodzą?
- 2) Dlaczego do przerywania reakcji enzymatycznych stosowano w niektórych eksperymentach bufor EndoR-Stop, a w innych, precipitację DNA?

Praca p. Darii Krefft zawiera istotne elementy nowości naukowej obejmujące opracowanie biotechnologicznej metody otrzymywania endonukleazo-metylotransferazy TthHB27I oraz charakterystykę właściwości biochemicznych i fizykochemicznych tego enzymu. Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr Darii Krefft pt. „Bifunkcyjna endonukleaza restrykcyjna TthHB27I: analiza właściwości oraz

zwielokrotnienie biosyntezy enzymu poddanego inżynierii chemicznej kodującego genu” 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 Darii Krefft do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na zakres i jakość wykonanych prac eksperymentalnych, znakomite przygotowanie manuskryptu pracy oraz znaczący dorobek publikacyjny wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Darii Krefft.

A handwritten signature in blue ink, reading "Paweł Sachadyn". The signature is written in a cursive, flowing style.