



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

**KNO** | Krajowy Naukowy  
Ośrodek Wiodący

Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Hallera 107, 80-416 Gdańsk

dr hab. Arkadiusz Piotrowski, prof. nadzw. GUMed  
Prodziekan ds. Nauki  
email: arek.piotrowski@gumed.edu.pl  
Tel.: 662 02 69 59

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Joanny Żebrowskiej  
pt. „Charakterystyka i inżynieria aktywności enzymatycznej  
termostabilnych endonukleaz restrykcyjnych należących do typu IIS”**

Endonukleazy restrykcyjne są podstawowym narzędziem biologii molekularnej i inżynierii genetycznej. W ostatnich latach, termostabilne endonukleazy restrykcyjne typu IIS stały się atrakcyjnym obiektem badań, ze względu na ich możliwe zastosowania w dynamicznie rozwijającej się genomice, a w szczególności w metodach wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA. Poszukiwanie nowych termostabilnych REaz typu IIS z naturalnych źródeł, badania i modyfikacje ich charakterystyki biochemicznej napędzane są przez wysoki potencjał wdrożeniowy tych enzymów. W konsekwencji opracowanie standardowych procedur analizy biochemicznej i fizykochemicznej termostabilnych REaz typu IIS staje się koniecznością, ponieważ standardowe procedury analizy umożliwiają bezpośrednie porównywanie wyników badań różnych REaz. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cenny wkład do powyższej tematyki.

Do recenzji dostarczono rozprawę doktorską liczącą 191 stron łącznie z wykazem piśmiennictwa. Układ pracy jest standardowy, przy czym wyniki połączone z dyskusją – taki zabieg jest dosyć często spotykany w publikacjach naukowych i jak najbardziej dopuszczalny. Od strony redakcyjnej praca została przygotowana starannie, jedynie z drobnymi uchybieniami, które nie miały wpływu na ocenę pracy. Umieszczenie numerów i tytułów w stopce tabel i rycin jest nieco niewygodne w odbiorze, w szczególności w przypadku wielostronicowych tabel. Ogólnie przyjętym standardem jest umieszczenia tytułu i numeru porządkowego w nagłówku tabeli, a legendy w stopce. Ponadto w tekście znajdują się inne drobne błędy redakcyjne, np. w Tabeli nr 4 – przesunięcie cytowania jednego ze źródeł do niewłaściwego wiersza.

Wstęp teoretyczny napisany został w bardzo przystępny sposób, doktorantka przechodzi stopniowo od niemal popularnonaukowego opisu do kwestii ściśle naukowych i technicznych. To świadczy o lekkości pióra doktorantki i talencie dydaktycznym. Ponadto tekst uzupełniony jest równie przystępnymi i dobrze skomponowanymi rycinami.

Wstęp rozpoczyna się od charakterystyki taksonomicznej i filogenetycznej oraz ogólnego opisu biologii wybranych rodzajów bakterii termofilnych, z których wywodzą się enzymy badane w przedstawionej do oceny rozprawie. Zostały także omówione systemy obronne bakterii-gospodarza przed obcymi elementami genetycznymi, z szczególnym wyeksponowaniem

systemów RM, jako najbliższych powiązanych z tematyką pracy. Doktorantka szczegółowo przedstawiła cechy poszczególnych typów endonukleaz restrykcyjnych, z naciskiem na Typ II, a także na termostabilne REazy, wraz z omówieniem modyfikacji aktywności enzymatycznej. Wstęp zawiera również odniesienia do wątków pobocznych, niezwiązanych bezpośrednio z tematyką rozprawy, które jednak nie burzą ogólnej harmonii tekstu.

Nadrzędny cel pracy został sformułowany w zagmatwany sposób, ponieważ zawiera niepotrzebne stwierdzenia dotyczące możliwych zastosowań wyników pracy, przy czym te zastosowania *per se* nie były tematem rozprawy i nie były poddane ocenie eksperymentalnej podczas przeprowadzonych badań. Analogicznie nieprecyzyjne sformułowanie znajduje się w streszczeniu: „celem pracy było stworzenie narzędzi służących ulepszeniu badań genomowych”. To jest mylący ogólnik, chociaż wyniki pracy z pewnością stanowią solidne podwaliny do kolejnych projektów służących praktycznemu wykorzystaniu scharakteryzowanych w przebiegu badań endonukleaz restrykcyjnych i S-adenozyl-L-cysteiny jako nowego analogu strukturalnego kofaktora allosterycznego S-adenozyl-L-metioniny. Uważam, że omówienie możliwych zastosowań wyników pracy zasadniczo powinno być znaleźć się wyłącznie w dyskusji, ewentualnie we wstępie recenzowanej rozprawy.

Początkowe negatywne wrażenie, wynikające ze sposobu przedstawienia nadrzędnego celu pracy, kompensuje opis celów szczegółowych, które obejmowały: (i) poszukiwanie, izolację (w tym klonowanie i ekspresję kodujących genów) i analizę biochemiczną nowych termostabilnych endonukleaz restrykcyjnych; (ii) syntezę S-adenozyl-L-cysteiny (SAC) jako nowego analogu strukturalnego kofaktora allosterycznego S-adenozyl-L-metioniny (SAM) oraz testy SAC jako czynnika modyfikującego swoistość termostabilnych nukleaz restrykcyjnych typu IIS; (iii) „opracowanie metod” analizy parametrów fizykochemicznych termostabilnych enzymów typu IIS. W przypadku ostatniego celu szczegółowego nie zgadzam się z określeniem „opracowanie metod”, ponieważ w badaniach zastosowano dobrze znane konwencjonalne metody. Lepszym określeniem byłoby „opracowanie procedury”, która rzeczywiście jest oryginalna, a jej potencjalne zastosowania uniwersalne, stąd z pewnością może zostać wykorzystana jako standard w przyszłych projektach.

Cześć metodyczna rozprawy została przygotowana bardzo starannie i szczegółowo. Jedynie w opisie sekwencjonowania DNA metodą Sangera zabrakło informacji czy sekwencjonowanie zostało wykonane jedno- czy dwukierunkowo (opis wyników na s. 103 sugeruje, że sekwencjonowanie wykonano z użyciem jednego startera). Taka informacja jest istotna, ponieważ ma wpływ na ocenę wiarygodności stwierdzonych wariantów sekwencyjnych.

Ponadto, ze względu na złożoność badań i mnogość zastosowanych metod, pomocny mógłby być schemat blokowy obrazujący całość przeprowadzonych badań i wzajemne powiązania pomiędzy poszczególnymi etapami. Podobnie, przedstawienie bardziej złożonych procedur laboratoryjnych w postaci wypunktowanej listy ułatwiłoby korzystanie z opisanych metod w kolejnych projektach. Powyższe uwagi mają jednak charakter kosmetyczny. Ogólnie, opis materiałów i metod przekracza standard spotykany w zbliżonych tematycznie pracach, a to oceniam bardzo wysoko.

Wyniki pracy są zasadniczo kompleksowo zaprezentowane, wielokierunkowe i oparte na wykorzystaniu niezależnych metod, a ich interpretacja jest rzeczowa, poprawna i połączona z krótką, aczkolwiek treściwą dyskusją. Tym niemniej, mam kilka uwag, które przedstawiłem poniżej.

Odnosnie ustalenia przynależności taksonomicznej na podstawie sekwencji 16S rRNA: można było użyć innych, bardziej polimorficznych markerów służących do klasyfikacji niższych jednostek taksonomicznych. Alternatywnie, wykonanie sekwencjonowania i wstępnego złożenia sekwencji całego genomu nie stanowi obecnie nadmiernego wyzwania zarówno pod względem kosztów, jak i wykonania niezbędnej analizy bioinformatycznej, a mogłoby dostarczyć cennych dla biotechnologii wyników, np. dotyczących występowania bakteriofagów lub (mega) plazmidów.

Sekwencjonowanie całego genomu mogłoby również stanowić kompleksowe podejście do poszukiwań genów kodujących enzymy z rodziny REazo-MTaz Thermus w DNA genomowym *Geobacillus sp.* (rozdział 7.14). Doktorantka jest świadoma z korzyści jakie dałoby w tym przypadku sekwencjonowanie całego genomu i nawiązuje do tego aspektu w związanej dyskusji (s. 129). Tym niemniej należy przyznać, że zastosowane przez doktorantkę prostsze i z pewnością mniej kosztowne rozwiązanie przyniosło oczekiwany rezultat.

Doktorantka podaje, w interpretacji wyników zaprezentowanych na Rys. 35, że „pozycja prążka odpowiadającego prawdopodobnie R.GeoICI określona została na podstawie korelacji wyników rozdziału elektroforetycznego z aktywnością enzymatyczną” poszczególnych frakcji przedstawioną na Rys. 34. Wskazany na Rys. 35 prążek w mieszaninie frakcji 3 i 4 obecny jest jednak również we frakcji 5, która nie wykazała aktywności restrykcyjnej. Być może wynika to z niezauważalnych różnic masy cząsteczkowej prążków przy rozdzielczości Rys. 35 umieszczonego w rozprawie. Ten fakt nie powinien być jednak pozostać bez wyjaśnienia w opisie wyników.

Mam również uwagę do jakości prezentacji wyników przedstawionych na Rys. 39 i 40. Żele poliakrylamidowe wybarwione metodą Coomassie są prawie nieczytelne i w konsekwencji nie nadają się do interpretacji. Prawdopodobnie wynika to z względnie niskiej czułości zastosowanej metody barwienia, oraz ze sposobu reprodukcji obrazów w rozprawie. Uważam, że w takim przypadku należało ograniczyć prezentację wyników do żeli barwionych srebrem, których jakość jest satysfakcjonująca i umożliwia pełną interpretację wyników.

Praca nie zawiera typowych wniosków, tylko ich rozszerzoną wersję zatytułowaną „podsumowanie”. Takie rozwiązanie jest jednak w pełni uzasadnione, ponieważ opisowy charakter pracy wymagał szerszego podsumowania, a nie tylko syntetycznej listy wniosków.

Przedstawiona do recenzji praca ma w dużej mierze charakter obserwacyjno – opisowy. Tego typu prace, często niesłusznie, uważane są za mniej wartościowe niż klasyczne rozprawy oparte na eksperymentalnej weryfikacji postawionych hipotez. W przypadku recenzowanej rozprawy, szeroki i pod wieloma względami wyczerpujący zakres badań umożliwił wykonanie niezależnych metodycznie obserwacji, a w konsekwencji wyciągnięcie wiarygodnych wniosków pozwalających na wytyczenie kierunków dalszych badań. Praca jest bardzo bogata

warsztatowo, z perspektywami do wykorzystania tego warsztatu w przyszłości. Wielokierunkowość strategii badawczej, oraz powiązana mnogość zastosowanych rozwiązań metodycznych, jest wyróżniająca i moim zdaniem przekracza wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wyniki badań zostały również opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych.

Ponadto, na osobne omówienie zasługuje wysoki potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników. W klasycznych zastosowaniach endonukleaz restrykcyjnych, cięcie w pewnej odległości od miejsca rozpoznawanego, przesunięcie miejsca cięcia oraz aktywność „star” są zazwyczaj cechami niepożądanymi. Tym niemniej, w coraz szerzej stosowanej metodzie wysokoprzepustowego sekwencjonowania równoległego (ang. massively parallel sequencing), zwanego również sekwencjonowaniem następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing - NGS), wymienione cechy enzymów są jak najbardziej pożądane. Konstrukcja biblioteki fragmentów do sekwencjonowania w idealnej sytuacji powinna być procesem o jak najbardziej przypadkowej dystrybucji miejsc fragmentacji matrycowego DNA, przy jednoczesnym zachowaniu wąskiego zakresu wielkości uzyskanych fragmentów. Początkowo używano w tym celu specjalistycznych sonifikatorów. Takie rozwiązanie obarczone jest jednak wadami, m.in. wysokim kosztem urządzeń, niepełną kontrolą nad przebiegiem fragmentacji, oraz ograniczonymi możliwościami automatyzacji w celu równoległego przetwarzania wielu prób. Dodatkowo, sonifikacja generuje fragmenty o znacznym udziale długich końców jednoniciowych, które są naprawiane na drodze enzymatycznej z niską efektywnością i jako takie nie mogą służyć jako substrat do konstrukcji biblioteki do sekwencjonowania. Stąd w sekwencjonowaniu wysokoprzepustowym istnieje duże zapotrzebowanie na zastąpienie fizycznych metod fragmentacji DNA metodami enzymatycznymi. Wiele metod opartych o enzymatyczną fragmentację DNA jest jednak obciążonych niepełną losowością procesu fragmentacji, związaną m.in. ze zbyt rzadkim cięciem i w obrębie rozpoznawanego motywu sekwencji. Wyniki ocenianej rozprawy mają wysoki potencjał wdrożeniowy, ponieważ z pewnością mogą stanowić cenny wkład w rozwój metod służących przygotowaniu bibliotek losowych fragmentów do wysokoprzepustowego sekwencjonowania równoległego.

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 Joanny Żebrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Arkadiusz Piotrowski, prof. nadzw. GUMed

Gdańsk, 13 kwietnia 2017 roku