

Prof. dr hab. inż. Maciej Bagiński
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
Ul. Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk, Polska
Tel.: (58) 347 15 96
Fax: (+48) (58) 347 11 44
e-mail: chemmbag@pg.gda.pl



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

Gdańsk, 30.03.2017

**Recenzja pracy doktorskiej
Mgr. Joanny Żebrowskiej**

Pt.:

Charakterystyka i inżynieria aktywności enzymatycznej termostabilnych endonukleaz

restrykcyjnych należących do Typu IIS

Przedstawiona do recenzji praca stanowi omówienie i dyskusję wyników badań prowadzonych przez mgr Żebrowską pod kierunkiem Prof. dr hab. Piotra Skowrona w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Celem pracy *sensu largo* było znalezienie i scharakteryzowanie pod względem biochemicznym i biofizycznym nowych narzędzi molekularnych do manipulacji DNA, które to narzędzia mogą być przydatne w badaniach genomowych, metagenomicznych, w diagnostyce molekularnej i w inżynierii genetycznej. W szczególności doktorantka w pracy zajmowała się nową endonukleazą restrykcyjną (REaz R.GeoICI) należącą do typu IIS, którą wyizolowała ze szczepu termofilnych bakterii *Geobacillus sp.* żyjących w glebach rejonów geotermalnych Islandii. Enzym ten jest nowym, termostabilnym izoschizomerem REazy Bbv1. W toku prac ustaliła też sekwencję rozpoznawaną przez ten enzym i miejsce cięcia DNA. Dodatkowo doktorantka zajmowała się wpływem zsyntezowanego w pracy analogu kofaktora S-adenozyl-L-metioniny (SAM), a mianowicie związku S-adenozyl-L-cysteiny (SAC), na aktywność termostabilnych enzymów typu IIS należących do rodziny REazo-metylotransferaz (Mtaz) *Thermus*. W genomie bakterii *Geobacillus sp.* bowiem znaleziono gen kodujący to białko enzymatyczne o podwójnej funkcji. W efekcie w ramach pracy utworzono narzędzie molekularne, pozwalające na kontrolowane manipulacje DNA poprzez zastosowanie analogu kofaktora SAM – SAC powodującego wzrost aktywności i zmianę specyficzności enzymatycznej RM.Tsol. W pracy autorka zajmowała się również określeniem właściwości biochemicznych i biofizycznych tych ostatnich enzymów.

Na samym początku swojej recenzji chciałbym zaznaczyć, że cele pracy były bardzo ambitne i trudne ale mimo to w całości zostały zrealizowane. Praca miała charakter multidyscyplinarny i obejmowała mikrobiologię, biologię molekularną, chemię organiczną, biochemię oraz biofizykę. Doktorantka zdecydowaną większość eksperymentów wykonała samodzielnie, a jedynie w niektórych obszarach korzystała czy to z komercyjnych analiz

wykonanych przez zewnętrzne firmy czy też z pomocy naukowców z Wydziału, którzy wykonywali pewne tylko pomiary biofizyczne. Udział tych wszystkich zewnętrznych osób i firm został poprawnie odnotowany w pracy.

Na szczególne podkreślenie zasługuje element nowości naukowej zaprezentowany w pracy. Oceniając bowiem sam cel pracy i ogólnie jego realizację muszę powiedzieć, że byłem pod wrażeniem zarówno wagi postawionych sobie celów, nowatorstwa, jak i ogromu pracy, którą doktorantka musiała włożyć aby zrealizować te cele. Przy czym na pewno oprócz wiedzy i umiejętności oraz pracowitości potrzeba było trochę szczęścia w tych badaniach, gdyż znalezienie nowego systemu do manipulacji DNA w postaci nowej endonukleazy nie zdarza się tak często. Dodatkowo ustalenie, że endonukleaza REaz-metylotransferaza *Thermus* może być skutecznie modulowana czy też sterowana przez analog kofaktora w kierunku nabycia właściwości szybko tnącego enzymu tnącego DNA w specyficznych miejscach nie jest trywialne. W tym obszarze zespół prof. P. Skowrona już odnotował sukcesy, a obecna praca jest kolejnym, który w dalszej perspektywie może znaleźć przełożenie na praktyczne zastosowanie. W tym miejscu, jako recenzent, pozwolę sobie na pewne porównanie jakie nasunęło mi się podczas czytania pracy. Otóż czułem się trochę jak widz w kinie, na wielkiej „hollywoodzkiej produkcji” która jak to jest w stereotypie Hollywood, kończy się zawsze happy-endem. W przypadku tej pracy nie tylko mamy do czynienia ze „szczęśliwym zakończeniem”, czyli całkowitą realizacją postawionych sobie ważnych naukowo celów, ale również należy podkreślić, że znalezione i scharakteryzowane nowe narzędzia do manipulacji DNA otwierają dalsze obszary badań w zakresie określania właściwości tych układów, optymalizacji i zastosowania w praktyce.

Układ pracy:

Na początku chciałbym nadmienić, że pracę bardzo dobrze czyta się mimo, że jest stosunkowo długa i zawiera ogromną ilość detali. Praca ma klasyczny układ dla tego typu prac eksperymentalnych. Na początku przedstawiony jest cel pracy po którym zamieszczono streszczenie w j. polskim i j. angielskim. Następnie praca zawiera obszerny i bardzo merytorycznie związany z celami pracy wstęp teoretyczny. Po wstępie następuje rozdział przedstawiający materiały a kolejny przedstawia metody. Przy czym, ten ostatni rozdział osobno przedstawia metody z obszaru mikrobiologii, metody wykorzystywane podczas pracy z DNA i metody stosowane podczas pracy z białkami, jak również osobno metody z zakresy chemii organicznej i fizykochemii. Następnie doktorantka przedstawia rozdziały z wynikami i dyskusją z podziałem na obszary badań. Na końcu jest podsumowanie i spis literatury zawierający 234 pozycje. Do pracy na końcu dołączone są pierwsze strony pięciu publikacji, w których doktorantka jest współautorem.

Jako recenzent wielu różnych prac, muszę w tym miejscu odnotować, że coraz częściej doktoranci i magistranci nie potrafią poprawnie opisać językowo celu pracy myląc go z zakresem pracy, tak jak to ma miejsce również w tym przypadku. Celem pracy bowiem nie było, jak zostało napisane przez mgr Żebrowską na str. 12, poszukiwanie, izolowanie, klonowanie itd. Celem pracy było znalezienie i scharakteryzowanie nowych narzędzi do manipulacji DNA, co napisałem we wstępie swojej recenzji. A te wszystkie analizy i badania biologiczno-biochemiczno-biofizyczne były jedynie drogą do osiągnięcia tych celów.

Jeżeli chodzi o ogólną ocenę poszczególnych rozdziałów to treść ich jest bardzo merytoryczna. Generalnie nie mam do ich zawartości jakiś większych uwag. Listę uwag bardziej szczegółowych i pytań przedstawię poniżej. Rozdziały dotyczące materiałów i metod są bardzo wyczerpująco napisane. Wszystkie metody są jasno i przystępnie opisane jak również całe postępowanie eksperymentalne jest tak przedstawione, że inne osoby nie powinny mieć problemów z powtórzeniem poszczególnych eksperymentów. Dobór metod jest właściwy. Na wielu etapach pracy stosowano różne metody aby ustalić jednoznacznie

odpowiednie dane. Tak było m.in. przy określaniu gatunku wyizolowanej bakterii czy też przy określeniu sekwencji rozpoznawanej i miejsca cięcia DNA przez R.GeoICI.

Na wyróżnienie zasługują rozdziały z przedstawieniem i dyskusją wyników. Rozdziały te są również bardzo przejrzyste napisane. Przedstawione dane nie budzą wątpliwości. Ich prezentacja jest profesjonalna i zawiera bardzo dużo szczegółów ważnych z punktu widzenia eksperymentalnego.

W całej pracy znajduje się też bardzo wiele odniesień do źródłowej (trochę starszej) i bieżącej literatury (nawet prace z 2016 r są cytowane) co wskazuje na rozległą wiedzę Doktorantki w obszarze prowadzonych badań. Przegląd literaturowy i analiza danych w dziedzinie objętej badaniami jest bardzo wnikliwa i ściśle związana z poszczególnymi zagadnieniami podejmowanymi w pracy doktorskiej.

Warto też pochwalić edytorski aspekt pracy związany z prezentacją rysunków, wykresów oraz schematów a przede wszystkim tabel. Wszystkie te rysunki są profesjonalnie przedstawione i posiadają bardzo dobre opisy, w których tam gdzie jest uzasadnione używa się kolorów dla ułatwienia czytania informacji na rysunku. Jeżeli chodzi o sam język pracy to jest bardzo poprawny. Znalazłem jedynie kilka błędów stylistycznych i tak zwanych literówek, co przy tak długim tekście jest trudne do uniknięcia.

Uwagi i komentarze ogólne:

Tak jak wspomniałem na wstępie praca jest bardzo ciekawa i nowatorska, a jej wyniki istotne ze względu na postęp wiedzy w dziedzinie tworzenia nowych narzędzi do manipulacji DNA. Autorce udało się odkryć i scharakteryzować takie nowe narzędzie wykonując żmudną pracę mikrobiologiczną, a następnie izolując ze szczepów bakteryjnych i charakteryzując nowe enzymy w tym endonukleazę R.GeoICI. Praca z tego względu niesie bardzo duży element nowości naukowej. Do części pracy będącej dyskusją i takiego przedstawienia wyników nie mam jako recenzent zastrzeżeń. Wyniki tej pracy zwłaszcza, że zostały już w części opublikowane stanowią istotny wkład w rozwój narzędzi biologii molekularnej.

Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zwrócić uwagę, że czytając pracę znalazłem kilka różnych miejsc gdzie nie w pełni byłem usatysfakcjonowany opisem, gdyż tekst nie zawierał wystarczającego opisu lub zawierał taki, który nie był w pełni zrozumiały. Stąd też poniżej przedstawiam kilka uwag mniej lub bardziej szczegółowych (w tym edytorskich) wymagających lub nie komentarza.

Uwagi i komentarze szczegółowe (przy czym nie wszystkie wymagają odpowiedzi czy komentarza, gdyż stanowią jedynie uwagę):

Rozdział 1:

Strona 12:

W celu pracy autorka podaje że będzie opracowywać metody analizy parametrów fizykochemicznych ... itd. ale jest to nieprecyzyjne gdyż metody opracowuje się w konkretnym celu. W tym przypadku raczej autorka nie opracowywała metod a je stosowała dla konkretnego układu i to było nowością naukową.

Rozdział 2:

Strona. 12-13:

Początek streszczenia w j. polskim i j. angielskim różnią się co do zawartości.

Rozdział 3.

Str. 16:

Pierwsze zdanie wstępu wskazuje jakoby gleba była ziemskim żywiołem – skąd taka definicja?

Rys. 1.

W legendzie do rysunku nie ma opisu koloru czerwonego.

Strona 17:

Jako metodę poszukiwania nowych organizmów o potencjalnym znaczeniu przemysłowym lub naukowym autorka wymienia „izolowanie organizmów o pożądanym cechach”. Jest to dość nieprecyzyjne bo w większości przypadków dopiero po wyizolowaniu takiego organizmu można dopiero ustalić czy posiada on pożądane właściwości.

Strona 18:

Jest tu pierwsza tabela i autorka dość nietypowo przedstawia opis tabeli pod tabelą. W publikacjach opisy tabel są przed tabelą. Uwaga ta dotyczy wszystkich tabel.

Strona 23:

Autorka pisze, że bakterie rodzaju *Geobacillus* zaliczane są do bakterii termofilnych umiarkowanych i właściwych, a później podaje informację, że występują one w umiarkowanych i średnioumiarkowanych środowiskach gdzie panuje niska temperatura (Andy, Rów Mariański) – to jak to jest z tymi bakteriami?

Strona 25:

Autorka nie wyjaśnia dlaczego wielkość endospory może mieć znaczenie dla rozprzestrzeniania się bakterii z rodzaju *Geobacillus*.

Strona 30:

Rys. 7 jest mało czytelny – za małe litery.

Strona 34:

Autorka przedstawia tutaj hipotezę o CRISPR który działa jako element pamięci genetycznej i ochrona przed kolejną infekcją bakteriofagową. Czy wiadomo jak to działa na poziomie komórkowym?

Strona 41:

W tekście „Ogromny wpływ na termostabilność białka mają oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe. Na większą termostabilność wpływa zwiększenie liczby wiązań wodorowych między cząsteczkami naładowanymi z neutralnymi” nie wiadomo o jakie wiązania wodorowe chodzi? Być może autorka miała na myśli wiązania wodorowe między resztami aminokwasowymi w danym białku?

Strona 42:

Zdanie „Wzrost entropii powoduje termiczne rozfałdowanie struktury białka i obniżenie energii swobodnej tego rozfałdowania”. Jest raczej odwrotnie to dana struktura białka, która ma zdolność do rozfałdowania powoduje wzrost entropii co prowadzi do obniżenia energii swobodnej tego rozfałdowania.

Rozdział 7.

Strona 105:

Bakterie *Geobacillus* pomimo swojej klasyfikacji do rodziny *Bacillaceae* (bakterie Gram dodatnie) wykazują Gram ujemność. Jak to można wyjaśnić?

Strona 122:

Czy mechanizm rozpoznawania sekwencji i miejsca cięcia DNA przez REazę R.GeoICI jest zgodny z mechanizmem przedstawionym na Str. 12 Rys. 40 i czy niejako go potwierdza?

Strona 126:

Maksimum aktywności enzymu REazę R.GeoICI przypada w przedziale 50 do 100 mM stężenia NaCl. Jak to się ma do środowiska fizjologicznego w komórce bakteryjnej?

Rozdział 8.

Strona 148:

Mimo, że rola RM.Tsol/DMSO wykracza poza zadania prezentowanej pracy autorka przedstawia wyniki wpływu DMSO na aktywność enzymu, dlatego brakuje w tym miejscu informacji jaką molekularną rolę może pełnić DMSO w tym układzie enzymatycznym.

Rozdział 9.

Strona 160:

Prosiłbym o wyjaśnienie jakie może być źródło różnic w wyznaczaniu masy cząsteczkowej enzymu syn-RM.TaqII pomiędzy metodą teoretyczną (opartą na sekwencji), a metodami eksperymentalnymi.

Strona 161:

Co autorka ma na myśli używając zwrotu „moc cieplna” – pierwsze zdanie na stronie?

Strona 162:

Jak autorka rozumie stwierdzenie: „Rezultat (chodzi o widma CD) sugeruje, iż w strukturze przestrzennej białka syn-RM.TaqII w formie aktywnej przeważa w zawartości α -helis, a dopiero po przekroczeniu T_m enzymu następuje częściowe rozfałdowanie białka, powodujące eksponowanie struktur drugorzędowych β -kardtek? Czy te struktury β -kardtek są zatem cały czas obecne w białku i dopiero są odsłaniane w czasie rozfałdowania ale ich nie widać w natywnym białku, czy też tworzą się w procesie rozfałdowania jako struktury przejściowe?

Generalna uwaga co do przedstawiania literatury w spisie:

Odnośniki w spisie literatury do stron domowych czy też baz danych powinny mieć daty, gdyż niestety niektóre takie pozycje stają się nieaktualne z czasem.

Podsumowanie:

Pomimo moich pewnych uwag krytycznych przedstawionych powyżej, z których część ma jedynie charakter pytań czy dyskusji naukowej lub uwag korekcyjnych, bardzo wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji pracę Pani mgr. Joanny Żebrowskiej. Zwłaszcza duży wkład nowości naukowej i osiągnięcie w pełni postawionych sobie ambitnych celów jest przeze mnie wysoko ocenione. Sama praca stanowi dokumentację oryginalnych badań

prowadzonych przez Doktorantkę, które w dużej części zostały opublikowane co stanowi o wysokich walorach naukowych i dużym wkładzie nowości naukowej całej pracy.

Moim zdaniem praca doktorska Pani Żebrowskiej całkowicie, i to z naddatkiem, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w pkt. 13 Ustawy o tytule i stopniach naukowych. Praca wskazuje także, że Doktorantka posiada rozległą wiedzę w dziedzinie biotechnologii aplikacyjnej i chemii układów enzymatycznych. W toku realizacji pracy wykazała Ona również umiejętność samodzielnego prowadzenia skomplikowanych badań naukowych w różnych obszarach od mikrobiologii przez chemię do biofizyki. Z podanych wyżej względów wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Joanny Żebrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na to, że efektem pracy doktorskiej było powstanie i mocno udokumentowane scharakteryzowanie nowego narzędzia molekularnego do manipulacji DNA, co nie zdarza się często, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Żebrowskiej.

