



Łódź, 19 września 2023

Prof. dr hab. Jarosław Dziadek
Kierownik Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium
Instytut Biologii Medycznej PAN

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Nowickiej pt. „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA”.

Polimerazy, w tym polimerazy DNA zależne od DNA, są kluczowymi dla metabolizmu kwasów nukleinowych enzymami uczestniczącymi w szeregu podstawowych procesów w komórce takich jak replikacja, transkrypcja czy naprawa DNA. Enzymy te różnią się zdolnością do syntezy *de novo* kwasów nukleinowych, wykorzystania jako matrycy DNA lub RNA, procesywnością, zdolnością do prowadzenia syntezy niezależnej od matrycy, częstością wprowadzania błędów i wielu innymi istotnymi cechami decydującymi o ich zaangażowaniu w określonych procesach w komórce. Niewątpliwym przełomem poznawczym dotyczącym mechanizmów funkcjonowania komórki było odkrycie przez Arthura Kornberga polimerazy I u *E. coli*, natomiast z punktu widzenia biotechnologii, inżynierii genetycznej, nie mniejsze znaczenie miało wyizolowanie termostabilnej polimerazy z *Thermus aquaticus* i jej zastosowanie w łańcuchowej reakcji polimerazy. Polimeraza Taq oraz inne znane obecnie termostabilne polimerazy, różniące się między sobą wiernością, procesywnością, szybkością syntezy są obecnie podstawą zarówno badań poznawczych prowadzonych w laboratoriach biologii molekularnej, jak również w laboratoriach zajmujących się diagnostyką medyczną i weterynaryjną, badaniami środowiskowymi, czy oceną jakości żywności. Termostabilne polimerazy mimo kilkudziesięcioletniej obecności na rynku są produktem wciąż ulepszanym i rozwijanym aby sprostać obecnym potrzebom coraz liczniejszych zastosowań komercyjnych. Właśnie w ten proces rozwoju produktu biotechnologicznego wpisuje się idealnie praca Pani mgr inż. Joanny Nowickiej zmierzająca do pozyskania nowej, fuzyjnej polimerazy o ulepszonych właściwościach, o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce. Praca została wykonana pod opieką promotora dr hab. Marcina Olszewskiego co pozwoliło Doktorantce na



skorzystanie z wiedzy i doświadczeń prowadzonej przez niego grupy badawczej w aspekcie biotechnologii.

Za najważniejsze osiągnięcie Doktorantki uważam uzyskanie fuzyjnej, archealnej polimerazy V2 (Sso7d-Pvu-Sso7d), charakteryzującej się wysoką tolerancją w stosunku do typowych inhibitorów znajdujących się w materiałach klinicznych i środowiskowych.

Układ tekstu przedstawionej do recenzji dysertacji jest typowy dla prac eksperymentalnych. Część doświadczalna pracy jest poprzedzona dobrze przemyślanym wstępem literaturowym napisanym bardzo ładnym językiem naukowym, przedstawiającym historie odkrycia polimeraz oraz ogólną charakterystykę tych enzymów. Następnie ze względu na temat badań własnych Doktorantka przedstawia mechanizm działania polimerazy DNA w reakcji PCR, czynniki, które wpływają na zaburzenie tego procesu oraz czynniki wzmacniające reakcję, a także modyfikacje polimeraz DNA zmieniające ich właściwości. **W tej bardzo dobrze napisanej części pracy zabrakło mi może jedynie rozdziału poświęconego mutagenności procesu amplifikacji, czyli częstości wprowadzania błędów przez polimerazy w zależności od obecności bądź nie jednostek korektorskich. W Tabeli 7 przydałaby się natomiast kolumna opisująca rodzaj modyfikacji wprowadzonych do zamieszczonych w niej rekombinowanych enzymów tak aby nie trzeba było domyślać się ich z nazwy opisanych białek.**

Cel pracy jaki został postawiony przed Doktorantką przedstawiono w sposób klarowny wraz z wyczerpującym uzasadnieniem. Może jedynie polemizowałbym z Doktorantką czy celem było otrzymanie i charakterystyka fuzyjnych polimeraz czy też raczej uzyskanie rekombinowanej polimerazy o określonych właściwościach.

W rozdziałach Materiały oraz Metody Autorka zapoznaje czytelnika z zastosowaną metodologią badań. Wszystkie wykorzystywane procedury są dokładnie opisane w sposób umożliwiający ich odtworzenie w innym laboratorium.

Poszczególne etapy pracy przedstawione w rozdziale Wyniki zostały dogłębnie przemyślane i skrupulatnie zrealizowane. Jak w typowych pracach z zakresu inżynierii genetycznej, Doktorantka rozpoczęła część eksperymentalną badań od zaprojektowania i uzyskania konstruktów kodujących fuzyjne formy polimerazy. Zaprojektowano trzy układy badane oraz układ kontrolny przygotowane na bazie polimerazy Pfu oraz białek wiążących DNA Sso7d oraz NeqSSB, gdzie enzym Pfu występuje w fuzji C-terminalnej z dwoma



cząsteczkami Sso7d (V1), Pfu jest oflankowany przez białka Sso7d (V2) lub od strony N-końcowej przez białko NeqSSB a od C-końcowej przez Sso7d (V3) lub występuje w C-końcowej fuzji z Sso7d (Ref1). Ciekawym wyzwaniem Doktorantki było zastosowanie białka NeqSSB, które jest znacznie słabiej poznane niż białko Sso7d i dawało szansę na uzyskanie nowych właściwości fuzyjnej polimerazy. Doktorantka w obrazowy sposób przedstawia planowane konstrukty oraz strukturę wykorzystanych białek, nie do końca jest tylko dla mnie jasna informacja zawarta pod Rys. 11 gdzie Autorka wskazuje aminokwasy charakteryzujące się zmiennością, jednocześnie informując na poprzedniej stronie, że są to aminokwasy zakonserwowane, odpowiedzialne za interakcje z DNA. **Czy Doktorantka ma na myśli, że aminokwasy te podlegają konserwatywnej substytucji?** Myślę, że pomocnym byłoby zamieszczenie w części A ryciny fragmentów sekwencji obu białek z zaznaczeniem wskazanych reszt aminokwasowych. Wszystkie etapy konstrukcji są szczegółowo opisane i udokumentowane. Uzyskane konstrukty pozwoliły Doktorantce na uzyskanie rekombinowanych białek oczyszczonych w chromatografii metalopowinowactwa. **Chciałbym zapytać w jaki sposób Doktorantka oceniała czystość uzyskanych białek, ile ona wynosiła oraz czy nie rozważała zastosowania drugiego etapu oczyszczania w postaci kolumny jonowymiennej bądź filtracji żelowej?** Po uzyskaniu preparatów rekombinowanych polimeraz Doktorantka poszukiwała optymalnych warunków amplifikacji dla każdego z enzymów poprzez zastosowanie szeregu komercyjnie dostępnych buforów oraz różnych stężeń soli. Nie do końca przekonuje mnie podrozdział 8.3.1.2. opisujący dobór optymalnego stężenia soli. Po pierwsze zgodnie z danymi zawartymi w Tabeli nr 12 Doktorantka nie zna składu wyjściowego buforu Phusion HF użytego w reakcja z enzymami V2, V3 i Ref1 więc nie może określić końcowego stężenia badanych soli w buforze. Po drugie nie rozumiem dlaczego przy wartości 0 mM MgCl₂ (Rys. 25) aktywność V1 osiąga 100% aktywności kontroli a przy 0 mM KCl oraz (NH₄)₂SO₄ odpowiednio 30 i 20% aktywności kontroli, skład buforu we wszystkich tych przypadkach jest identyczny. W celu doboru optymalnego zakresu pH Doktorantka użyła 14 różnych komercyjnie dostępnych buforów różniących się składem i wartością pH. Dlatego też nie nazwałbym tego podrozdziału (8.3.1.3.) „Dobór optymalnego zakresu pH ...” tylko raczej „Dobór optymalnego buforu komercyjnego”, gdyż precyzyjny dobór optymalnego zakresu pH wymagałby w moim przekonaniu przeanalizowania aktywności badanych enzymów wyłącznie z jedną zmienną jaką byłaby wartość pH. **Proszę Doktorantkę o komentarz do powyższych kwestii.** Nie mam



natomiast zastrzeżeń do oceny przez Doktorantkę takich parametrów jak aktywności enzymów, określenie minimalnej liczby jednostek pozwalających na amplifikację DNA, określenie termostabilności, procesywności, czułości, zdolności do polimeryzacji matrycy bogatej w pary GC, czy szybkości syntezy. Niezwykle ważnym parametrem z punktu widzenia komercjalizacji wyników pracy miało wykonane przez Doktorantkę badanie amplifikacji DNA w obecności inhibitorów w postaci pełnej krwi pobranej na EDTA, heparyny, ampicyliny, izopropanolu, etanolu oraz kwasu humusowego. Przeprowadzone analizy pozwoliły Doktorantce nie tylko szczegółowo scharakteryzować uzyskane fuzyjne enzymy ale także wykazać duży potencjał polimerazy V2 dla laboratoriów diagnostycznych i środowiskowych.

Dyskusja pracy, połączona trochę nietypowo z Wnioskami, została napisana bardzo dojrzałe, ze znakomitą znajomością tematu, a Doktorantka w sposób krytyczny odnosi uzyskane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Świetnym podsumowanie przeprowadzonych przez Doktorantkę badań są Tabele 69 i 70 zawierające wszystkie najważniejsze obserwacje poczynione w trakcie realizacji pracy i pozwalające na precyzyjne porównanie badanych rekombinowanych polimeraz DNA z białkiem kontrolnym.

Podsumowanie:

Po wnikliwym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr inż. Joanny Nowickiej uważam, że przedstawiona do oceny praca zawiera oryginalne i bardzo wartościowe wyniki i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Zaprezentowana została ogólna wiedza teoretyczna Pani mgr inż. J. Nowickiej w zakresie dyscypliny nauki biologiczne, a sama rozprawa potwierdza Jej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i spełnia wszystkie kryteria zawarte w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UG o dopuszczenie Pani Joanny Nowickiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Kierownik
Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium


Prof. dr hab. Jarosław Dziadek