



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Instytut Nauk Medycznych
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 15.09.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny Nowickiej pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Nowickiej pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA” została przygotowana pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Olszewskiego, prof. PW oraz Pana oraz Pana dr inż. Kasjan Szemiako pełniącego rolę promotora pomocniczego. Praca doktorska była częścią wydziałowego projektu Młodych Naukowców pt.: „Fuzyjna polimeraza DNA z białkami wiążącymi jedno- i dwuniciowe DNA – produkcja, charakterystyka i zastosowanie w trudnych reakcjach PCR”.

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczy otrzymania oraz charakterystyki trzech wariantów fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA: V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. W pracy określono wpływ dwóch różnych białek wiążących DNA na właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA. Do badań wykorzystano modyfikacje polimerazy DNA Pfu, która jest uznawana za enzym o wysokiej wierności, termostabilności i odporności na niektóre inhibitory reakcji PCR.

Intensywny rozwój technik biotechnologii molekularnej, w tym metod opartych na reakcji PCR spowodował wzrost zapotrzebowania na polimerazy DNA o wysokiej wydajności i wierności. Metoda PCR, której zasadą jest amplifikacja fragmentu DNA z zastosowaniem polimerazy DNA stanowi podstawę diagnostyki molekularnej wielu chorób, w tym nowotworowych, zakaźnych i genetycznych. Metoda ta jest również stosowana w innych dziedzinach takich jak: rolnictwo, weterynaria czy archeologia. Coraz powszechniejsze zastosowanie technik molekularnych zarówno w medycynie jak i w innych dziedzinach sprawia, że istnieje konieczność opracowania nowych ulepszonych polimeraz odpornych na inhibitory zawarte w materiale badanym. Obecnie istnieje wzrastająca potrzeba zastosowania metod opartych na PCR zarówno w rutynowej diagnostyce molekularnej jak i w badaniach naukowych.

W związku z powyższym temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i istotny dla uzyskania wysokowydajnych, szybkich, czułych i dokładnych polimeraz DNA. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej mają niewątpliwie charakter wysoce aplikacyjny i mogą przyczynić się do udoskonalenia technik opartych na fuzyjnych polimerazach DNA, a co za tym idzie do postępu w diagnostyce molekularnej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wydana w formie opracowanego maszynopisu liczącego 203 strony. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na następujące rozdziały: wykaz stosowanych oznaczeń i skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, wnioski i dyskusja, podsumowanie, wykaz literatury, wykaz rysunków, wykaz tabel oraz przedstawienie dorobku naukowego Doktorantki. Bibliografia pracy obejmuje 151 anglojęzycznych pozycji literaturowych pochodzących głównie z ostatnich kilku lat. Praca doktorska zawiera 42 rysunki oraz 70 tabel, w większości obrazujących uzyskane wyniki, co pozwala na dokładne prześledzenie i analizę wszystkich wyników. Praca została starannie przygotowana pod względem graficznym, bardzo dobrze zredagowana oraz poprawnie napisana pod względem językowym. W tym miejscu należy jednak wskazać, że w wykazie stosowanych oznaczeń i skrótów nie wszystkie skróty, które mogłyby być podane jednocześnie w języku polskim i w języku angielskim zostały właśnie w ten sposób przedstawione. Przykładowo: skrót HF jest podany tylko w języku angielskim, a skrót PCNA tylko w języku polskim. Ponadto, nie podano w ogóle co oznacza skrót „TAE”; ani w wykazie

stosowanych oznaczeń i skrótów, ani w tekście pracy doktorskiej. Ponadto, na str. 107 podano pod rysunkiem nr 14, że zastosowano żel agarozowy 1,5%, natomiast w tekście powyżej rysunku nr 14 jest napisane, że zastosowano 1% żel agarozowy. Jednakże, takie drobne błędy czy nieścisłości nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Dodatkowo do pracy dołączono wykaz publikacji i komunikatów zjazdowych Doktorantki oraz listę projektów, w których Doktorantka brała udział. Dorobek publikacyjny Doktorantki stanowią 2 prace o wysokim współczynniku IF opublikowane w latach 2019-2020 (w tym jedna publikacja jako pierwszy autor), 1 doniesienie konferencyjne zaprezentowane w 2020 roku oraz uczestnictwo w 3 konferencjach krajowych i międzynarodowych zaprezentowane w latach 2018-2019. Ponadto Doktorantka była kierownikiem dwóch projektów wydziałowych dla Młodych Naukowców oraz współwykonawcą w projekcie OPUS14 finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Sumaryczny współczynnik oddziaływania dorobku publikacyjnego Doktorantki wynosi 10,4 i należy go uznać za wysoki biorąc pod uwagę wczesny etap kariery naukowej Doktorantki.

Cała rozprawa doktorska napisana jest w zwięzłym i syntetycznym stylu. Wstęp stanowi dokładną analizę aktualnego stanu wiedzy na temat podjętego problemu badawczego uzasadniając celowość prowadzonych badań. Wstęp jest podzielony na 5 podrozdziałów, w których przedstawiono szczegółowy opis dotyczący historii polimerazy DNA, polimeraz DNA wykorzystywanych w reakcji PCR, reakcji PCR, przykładów białek wykorzystywanych do tworzenia fuzyjnych polimeraz DNA oraz wyzwań i perspektyw dotyczących modyfikacji polimeraz DNA.

Cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie, charakterystyka oraz zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA *Pyrococcus furiosus*. Dodatkowym celem pracy było zbadanie wpływu wybranych inhibitorów na wydajność amplifikacji DNA przez fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. Cele badawcze pracy zostały prawidłowo zrealizowane za pomocą następujących etapów: 1. Projektowania i konstrukcji fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, 2. Produkcji i oczyszczania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, 3. Charakterystyki molekularnej fuzyjnych

form archealnej polimerazy DNA, 4. Zbadania potencjalnych aplikacji otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA, 5. Porównania odporności fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na znane inhibitory stanowiące problem w różnych obszarach diagnostyki molekularnej.

W pracy doktorskiej zastosowano następujące próbki kliniczne: sierść, wymazy, krew psia, a także pióra i krew gołębi oraz włosie końskie. W pracy wyszczególniono dokładnie wszystkie zastosowane materiały i odczynniki. Były to: dwa szczepy bakteryjne - szczep *Escherichia coli* BL RIL i szczep *Pyrococcus furiosus* DSM3638, DNA *Mycobacterium bovis*, plazmid rekombinowany pBAD/NeqSSB, plazmid rekombinowany pBAD/Sso7d, wektor ekspresyjny pET-30 Ek/LIC, komercyjne zestawy do izolacji/oczyszczania DNA genomowego i plazmidowego, zestaw do klonowania metodą Gibsona, dwa enzymy restrykcyjne – *BamHI* i *NdeI*, podłoża mikrobiologiczne i pożywki - pożywka płynna LB i pożywka stała LA, roztwory antybiotyków i odczynników do pracy z bakteriami, zestaw do oznaczania aktywności polimeraz DNA, sekwencje starterów do amplifikacji fuzyjnych form polimerazy DNA, sekwencje starterów do badania właściwości fuzyjnych form polimerazy DNA oraz sekwencje starterów do oznaczania procesywności otrzymanych fuzyjnych form polimerazy DNA. Ponadto w pracy podano nazwy zastosowanej aparatury, dokładny skład buforów i odczynników użytych w eksperymentach oraz szczegółowo opisano wszystkie etapy badawcze.

W pracy doktorskiej w sposób prawidłowy dobrano metody badawcze. Metody pracy zostały bardzo szczegółowo opisane. W opisie metodyki pracy podano szczegółowo skład wszystkich zastosowanych mieszanin reakcyjnych PCR oraz profile temperaturowo-czasowe wykorzystywane w reakcjach PCR. Uzyskane w pracy wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób, a właściwie dobrane tabele i wykresy ułatwiają ich analizę. W pracy wykorzystano dwa modele badawcze, tj. polimerazę DNA Pfu oraz białka wiążące DNA - Sso7d (wiążące dsDNA) i NeqSSB (wiążące ssDNA oraz dsDNA). W ramach realizacji niniejszej pracy zaprojektowano i otrzymano konstrukty genetyczne kodujące referencyjną polimerazę DNA Ref1 Pfu-Sso7d, jak też trzy fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA tzn. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, V2 Sso7d-Pfu-Sso7d oraz V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d. Wszystkie konstrukty, poza referencyjną polimerazą DNA Ref1 Pfu-Sso7d, zawierały dwie różne sekwencje łączników składających się z 6-ciu reszt aminokwasowych. Wykorzystanie łączników

umożliwiło kowalencyjne powiązanie wybranych białek wiążących DNA z referencyjną polimerazą DNA Ref1 Pfu-Sso7d, w sposób pozwalający na optymalne wzajemne zachowanie dystansu pomiędzy połączonymi białkami.

Kolejny etap pracy dotyczył produkcji, oczyszczania i charakterystyki trzech fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA oraz polimerazy DNA stanowiącej referencję. W celu potwierdzenia czy oczyszczone fuzyjne formy archealnej polimerazy DNA zostały skutecznie pozbawione pozostałości DNA gospodarza, wykonano wstępny test poprzez sprawdzenie czystości otrzymanych preparatów białkowych w agarozowym teście elektroforetycznym. Przeprowadzono także szczegółowe badanie wykonując reakcję PCR z udziałem starterów pozwalających na amplifikację fragmentu genu 16S-23S rDNA. Następnie każdy z otrzymanych wariantów fuzyjnych form polimerazy DNA został scharakteryzowany molekularnie, m.in. sprawdzono wydajność, ustalono liczbę aktywnych jednostek, zweryfikowano minimalną ilość jednostek w reakcji, określono stabilność w temperaturze pokojowej, oceniono szybkość syntezy DNA, dokonano analizy czułości i wydajności amplifikacji matryc bogatych w GC. Na podstawie uzyskanych wyników dowiedziono, że wariant posiadający obustronną fuzję tego samego białka partnerskiego (V2 Sso7d-Pfu-Sso7d) wykazuje wysoką wydajność enzymatyczną i amplifikuje DNA bez względu na zastosowane warunki reakcji PCR.

Kolejnym ważnym etapem pracy doktorskiej były eksperymenty związane ze sprawdzeniem odporności otrzymanych fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na następujące inhibitory: krew pełną pobraną EDTA, heparynę, ampicylinę, etanol, izopropanol oraz kwas humusowy. Zastosowane w pracy inhibitory są jednymi z najczęściej występujących w badanych próbkach inhibitorów, które mogą hamować reakcję PCR nawet w niskich stężeniach. W wyniku przeprowadzenia tych badań zaobserwowano, że największą odporność na każdy z zastosowanych inhibitorów wykazuje wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d. W tym miejscu należy zauważyć, że w dalszych badaniach warto byłoby również sprawdzić odporność fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA na inhibitory zawarte w tkance utrwalonej formaliną i zatopionej w parafinie, ponieważ taka forma materiału biologicznego jest obecnie najczęściej stosowana w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych w celu wyboru terapii celowanej.

Dyskusja rozprawy doktorskiej jest napisana w sposób rzeczowy i wnikliwy. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały skonfrontowane z najnowszymi wynikami opublikowanych badań o podobnej tematyce. Dyskusja w pełni ukazuje bardzo dobre zorientowanie Doktorantki w aktualnej literaturze dotyczącej problemu badawczego. Na podstawie uzyskanych wyników prawidłowo sformułowano wnioski końcowe wskazujące na to, że najbardziej uniwersalnym enzymem jest wariant V2 Sso7d-Pfu-Sso7d, wykazuje wysoką wydajność enzymatyczną i amplifikuje DNA praktycznie bez względu na zastosowane warunki reakcji PCR.

Wnioski Końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Autorki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Niniejsza praca doktorska ma wysoce aplikacyjny charakter; uzyskane wyniki mogą przyczynić się do udoskonalenia technik biologii molekularnej. Rozprawa doktorska pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA” w pełni spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021 poz. 478 ze zm). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Joanny Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną prowadzonych badań pragnę przedłożyć wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik