



Gdańsk 19.09.2023

Dr hab. inż. Piotr Szweda  
Katedra Technologii Leków i Biochemii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Gdańska

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

**Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej**

Opracowanie przez Kary'ego Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) zrewolucjonizowało nauki biologiczne. Nie sposób wyobrazić sobie współczesnej diagnostyki medycznej czy biotechnologii bez dostępu do tej techniki, która umożliwia szybką, stosunkowo tanią i niezbyt skomplikowaną pod względem technicznym amplifikację (powielenie) wybranych odcinków materiału genetycznego (DNA) w warunkach *in vitro*. Przy czym, kluczem do opracowania reakcji PCR był dostęp do termostabilnych wariantów enzymu – polimerazy DNA. Aktualnie reakcja PCR jest jedną z podstawowych technik eksperymentalnych stosowanych zarówno w laboratoriach badawczych jak i firmach świadczących usługi z zakresu biologii molekularnej i biotechnologii – np. diagnostyczne laboratoria medyczne, weterynaryjne czy kryminalistyczne, firmy biotechnologiczne specjalizujące się w przygotowywaniu konstruktów genetycznych (np. plazmidów) wykorzystywanych do otrzymywania białek rekombinantowych, roślin genetycznie modyfikowanych czy też kwasów nukleinowych o zastosowaniach terapeutycznych. Powoduje to, że skala zapotrzebowania na enzym – polimerazę DNA jest ogromna. Jednak najważniejszym wyzwaniem dla współczesnej biotechnologii jest nie skala popytu na to białko a konieczność otrzymywania coraz doskonalszych wariantów tego enzymu. I tak, na przykład w przypadku zastosowań związanych z sekwencjonowaniem, enzym powinien charakteryzować się dużą wiernością – co gwarantuje, że sekwencja amplikonów zsyntetyzowanych w wyniku reakcji PCR będzie identyczna z sekwencją matrycowego (badanego) DNA. Z kolei w przypadku zastosowań typowo diagnostycznych kluczowymi parametrami są chociażby : 1. czułość – najmniejsza ilość matrycowego DNA, która pozwala na jej amplifikację, 2. szybkość syntezy powielanego fragmentu DNA, co pozwala np. na skrócenie czasu analizy, 3. brak wrażliwości na inhibitory reakcji PCR co zapobiega otrzymywaniu wyników fałszywie negatywnych. Zmiana właściwości enzymu wymaga modyfikacji jego sekwencji aminokwasowej – wymianę określonych reszt aminokwasowych lub otrzymywanie tzw. białek fuzyjnych – zwykle połączenia właściwego enzymu z innymi białkami biorącymi udział w procesie replikacji (np. z białkami wiążącymi jednoniciowe lub dwuniciowe DNA). Zadaniem doktorantki było otrzymanie, charakterystyka oraz weryfikacja możliwości zastosowania fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA *Pyrococcus furiosus*. W mojej ocenie był to plan bardzo ambitny, który udało się zrealizować. Uzyskano nowe produkty biotechnologiczne o ciekawych właściwościach użytkowych, które mogą trafić na rynek. Jest to duży sukces zarówno Doktorantki jak i Promotorów, a aplikacyjny charakter prowadzonych badań jest bez wątpienia dużym atutem pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Nowickiej.



## Ocena formalna pracy doktorskiej

Kandydatka do stopnia naukowego doktora Pani mgr inż. Joanna Nowicka przedłożyła rozprawę doktorską pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA”, która została wykonana pod kierunkiem promotora Pana dr hab. inż. Marcina Olszewskiego oraz promotora pomocniczego Pana dr inż. Kasjana Szemiako. Promotor pracy jest pracownikiem Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Promotor pomocniczy związany jest z Laboratorium Genetycznym Zwierząt GeneVet Sp. z o.o. Dysertacja Pani mgr inż. Joanny Nowickiej ma klasyczny układ dla tego typu opracowań, jej najważniejszymi elementami są:

1. Wstęp teoretyczny – strony 25 – 56,
2. Spis stosowanych materiałów – strony 58 – 72,
3. Opis stosowanych metod eksperymentalnych – strony 73 – 102,
4. Przedstawienie i omówienie uzyskanych wyników – strony 103 – 154,
5. Wnioski i dyskusja – strony 155-172,
6. Podsumowanie strony - 173 i 174,

Ponadto w swojej dysertacji Pani mgr inż. Joanna Nowicka umieściła jasno sformułowany cel pracy (strona 57), streszczenia w dwóch wersjach językowych (strony 21-24), wykazy: oznaczeń i skrótów (strony 17-19), rysunków (strony 189-197), tabel (strony 198-201). Spis piśmiennictwa obejmujący 151 pozycji, w zdecydowanej większości publikacje z renomowanych czasopism naukowych opublikowane w przeciągu ostatnich 20 lat, przedstawiono na stronach 175-188. Na stronach 202 i 203 Doktorantka zaprezentowała spis swojego dorobku oraz spis projektów badawczych, w których aktywnie uczestniczyła - w dwóch przypadkach była kierownikiem. Taki układ dysertacji jest w mojej ocenie optymalny, nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Wstęp teoretyczny bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia, których dotyczy rozprawa. Spis stosowanych materiałów oraz opis stosowanych technik badawczych przygotowano w sposób bardzo przejrzysty umożliwiając odtworzenie eksperymentów. Wyniki zostały zaprezentowane są w sposób profesjonalny, szczególną rolę odgrywa w tym zakresie dokumentacja fotograficzna. W dalszych częściach powyższej recenzji pozwoliłem sobie wymienić najważniejsze uwagi merytoryczne oraz dotyczące kwestii edytorskich.

Należy przyznać, że pod względem formalnym praca przygotowana jest starannie. Nie stwierdziłem istotnych błędów w zakresie nazewnictwa fachowego, w tekście rozprawy pojawiają się nieliczne błędy edytorskie – tzw. literówki. Praca jest bogato ilustrowana – w tekście rozprawy umieszczono 42 rysunki i aż 70 tabel. Zarówno ryciny (w tym bardzo dobrej jakości zdjęcia żeli elektroforetycznych) jak i tabele umiejętnie wkomponowano w tekst opracowania co jest nie tylko istotne ze względów graficznych czy estetycznych, ale przede wszystkim ułatwia czytelnikowi zrozumienie analizowanego tekstu.

Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko o drobnych uchybieniach edytorskich (które nie mają praktycznie żadnego wpływu na ogólną ocenę pracy):

1. Strona 22 (streszczenie) – nie zastosowano kursywy w zapisie nazwy mikroorganizmu *Nanoarchaeum equitans*;
2. Strona 30 zamiast matrycykomplementarnego powinno być matrycy komplementarnego;
3. Strona 46 – zamiast polmerazy powinno być oczywiście polimerazy;
4. Strona 4 – na początku opisu rozdziału 4.4.1. „Najpopularniejszymi białkami wykorzystywanymi w fuzjach z polimerazami DNA są białka z rodziny Sul7d4. Są to hipertermofilne i kwasofilne archeony z ...” chyba wkradł się błąd – białka nie są archeonami;



5. Strona 73 – zamiast „schowano do zamrażarki niskotemperaturowej” proponowałbym umieszczono w zamrażarce niskotemperaturowej;
6. Strona 103 – Doktorantka odwołuje się do sekwencji starterów, które przedstawiono w punkcie 6.9.1, przy czym ten punkt znajduje się w rozdziale Materiały a nie Metody
7. Strona 112 – „przeprowadzono transformację DNA uzyskanych plazmidów ekspresyjnych do komórek *E. coli* BL RIL” – jest to zapis błędny, transformuje się komórki, w związku z czym bardziej prawidłowy byłby zapis: „komórki szczepu *E. coli* BL RIL transformowano za pomocą uzyskanych plazmidów ekspresyjnych”
8. Strona 161 – nie podoba mi się konstrukcja zdania: „Natomiast wykorzystując białko Sso7d do kowalencyjnego połączenia z polimerazą DNA Taq na jej końcu aminowym, przedstawiono przydatność takiego fuzyjnego enzymu do przeprowadzania reakcji PCR bezpośredniego z ludzkiej krwi pełnej oraz do wykrywania wirusa zapalenia wątroby typu B bezpośrednio z próbek klinicznych, bez potrzeby izolacji materiału genetycznego.”

Jak wspominałem powyżej są to drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość pracy.

### Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym rozprawę oceniam bardzo wysoko. Promotor pracy Pan dr hab. inż. Marcin Olszewski od wielu już lat specjalizuje się w otrzymywaniu i badaniu właściwości nowych wariantów polimeraz termostabilnych, i ma w tym zakresie szereg sukcesów zarówno o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym. Badania przeprowadzone przez Panią mgr inż. Joannę Nowicką bez wątpienia stanowią istotny wkład w badania zespołu Promotora. Najważniejszym osiągnięciem Doktorantki jest otrzymanie nowych wariantów termostabilnej polimerazy DNA *Pyrococcus furiosus* o ciekawych i pożądanых właściwościach użytkowych. Przy czym należy wyraźnie podkreślić, że sukces ten nie jest dziełem szczęścia czy przypadku. U podstaw tego sukcesu leży doskonała znajomość tematyki (oczywiście głównie przez Promotora) związanej z budową i właściwościami polimeraz DNA i innych białek biorących udział w procesie replikacji co umożliwiło już na poziomie planowania badań taki dobór elementów składowych polimeraz fuzyjnych, aby finalnie z dużym prawdopodobieństwem otrzymać enzym o założonych i pożądanых właściwościach. W przypadku inżynierii białek każdy, nawet pozornie najdoskonalszy projekt musi zostać zweryfikowany eksperymentalnie, a otrzymywane białko może wykazywać cechy zupełnie odmienne od założonych. W ramach pracy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Nowickiej przeprowadzono bardzo szczegółową weryfikację właściwości otrzymanych enzymów. Ogólnie badania wykonane w ramach powyższej pracy można podzielić na trzy podstawowe etapy:

1. Projekt i otrzymanie konstruktów genetycznych. W sumie przygotowano cztery konstrukty umożliwiające otrzymanie czterech różnych wariantów (V1-V4) fuzyjnej polimerazy Pfu:
  - 1.1. V1 Pfu-Sso7d-Sso7d - zawiera na C-końcu dwa białka Sso7d (białko wiążące dsDNA z termofilnego archeonu *Sulfolobus solfataricus*);
  - 1.2. V2 Sso7d-Pfu-Sso7d - zawiera dwa białka Sso7d na obu końcach;
  - 1.3. V3 NeqSSB-Pfu-Sso7d - zawiera na N-końcu białko NeqSSB (białko wiążące zarówno ssDNA jak i dsDNA wytwarzane w naturze przez *Nanoarchaeum equitans*), natomiast na C-końcu białko Sso7d
  - 1.4. V4 Pfu-Sso7d - enzym referencyjny, który na C-końcu zawiera białko Sso7d

Jak już wspominałem dobór „białek towarzyszących” właściwemu enzymowi – termostabilnej polimerazie Pfu został przeprowadzony racjonalnie w oparciu o doskonałą znajomość tematu. Natomiast poprawność przygotowanych



konstruktów genetycznych potwierdzono jednoznacznie poprzez sekwencjonowanie.

2. Produkcja i oczyszczanie białek rekombinantowych. Ta część badań także zakończyła się pełnym sukcesem. Doktorantka otrzymała oczyszczone preparaty wszystkich czterech wariantów fuzyjnej polimerazy. Oczyszczanie prowadzono z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa na złożach z unieruchomionymi jonami niklu. Było to możliwe dzięki włączeniu do sekwencji aminokwasowych produkowanych enzymów domeny oligohistydynowej His<sub>6</sub>. Na podstawie analizy zamieszczonych w dysertacji elektroforegramów można ocenić, że uzyskano preparaty o bardzo wysokim stopniu czystości.
3. Charakterystyka właściwości otrzymanych białek. Dotyczy ona zarówno ustalenia optymalnych warunków działania wszystkich wariantów enzymu, np. dobór buforu reakcyjnego i jego pH jak i określenia cech istotnych z punktu widzenia konkretnych zastosowań – np. zdolność amplifikacji fragmentów DNA zawierających duży odsetek par GC, stabilność w różnych warunkach temperaturowych, czułość, szybkość elongacji oraz wpływ inhibitorów, czy temperatury przyłączania starterów na wydajność reakcji amplifikacji. Uważam, że jest to bardzo istotny i ciekawy fragment pracy. Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono, że najciekawsze właściwości użytkowe wykazuje wariant V2, jedyną jego wadą jest niższa niż w przypadku pozostałych enzymów szybkość elongacji amplifikowanego fragmentu DNA. Należy także podkreślić, że do weryfikacji właściwości polimeraz stosowano matrycowe DNA wyizolowane z materiału klinicznego (np. krew, pióra czy sierść zwierząt). Ze względu na potencjalną obecność inhibitorów reakcji PCR tego typu materiał biologiczny można zaklasyfikować jako „trudne matryce”.

Nie mam wątpliwości co do tego, że w oparciu o uzyskane wyniki można przygotować bardzo dobrą publikację naukową lub zgłoszenie patentowe. Przynajmniej jeden z wariantów V2, w mojej ocenie także enzym referencyjny – V4 spełniają wymogi polimeraz komercyjnych.

Poniżej przedstawiłem kilka uwag merytorycznych odnośnie informacji zawartych w tekście dysertacji:

1. Szkoda, że na stronie 38 nie zamieszczono chociażby krótkiego opisu dotyczącego konstrukcji polimeraz typu hot-start, których stosowanie zapobiega powstawaniu produktów niespecyficznych;
2. Strona 41 - Jakiego typu podłoża ma na myśli Autorka? Byłbym wdzięczny za krótki komentarz;
3. Strona 45 – we fragmencie „w której zidentyfikowano dwie reszty w domenie śródścza polimerazy DNA oraz zamieniono je na argininę w celu poprawy właściwości tego enzymu.” Brak informacji o tym jakie dwie reszty aminokwasowe występowały w białku typu dzikiego, które wymieniono na reszty (czy reszty) argininy;
4. Strona 50 – w tekście pracy nie odnalazłem odwołania do Rysunku nr 5;
5. Na stronie 46 po zdaniu: „Modyfikacje głównie opierają się o zmianę reszt aminokwasowych lub dokonywanie fuzji z monomerycznymi białkami stabilizującymi DNA (m.in. Sso7d, NeqSSB, RB69SSB, TtePriB czy PfuDBDlig)” można było krótko napisać jaką funkcję fizjologiczną pełnią wymienione w nawiasie białka stabilizujące DNA i przez jakie organizmy są wytwarzane. Generalnie uważam, że lepszym pomysłem byłoby najpierw opisanie białek wykorzystywanych do tworzenia fuzyjnych polimeraz (aktualnie rozdział 4.4), a następnie przedstawienie charakterystyki samych polimeraz fuzyjnych (aktualnie podrozdział 4.3.4.2.2.)



6. Strona 53 – w rozdziale 4.5.1. Ograniczenia w projektowaniu polimeraz DNA informacje podane są w sposób mało usystematyzowany, jest to fragment pracy, który najmniej mi się podoba.
7. Strony 61-63 - w opisie do Tabel 10 i 11 należało dodać informację czy wymienione w nich startery są starterami oryginalnymi zaprojektowanymi na potrzeby powyższej pracy czy też są to startery, których sekwencje i cel stosowania opisano w literaturze;
8. Strona 80 – Autorka podaje informacje, że próby ekspresji białek rekombinantowych prowadzono z wykorzystaniem różnych szczepów ekspresyjnych *E. coli* (pLys S, BL RIL LEMO21), natomiast w spisie materiałów na stronie 58 podany jest tylko jeden szczep ekspresyjny *E. coli* BL RIL
9. Strona 104 – Rysunek 11C, czy ta struktura została ustalona (wymodelowana) przez Doktorantkę? W części metodycznej nie wspomniano o tym etapie badań.
10. Odczuwam pewien niedosyt odnośnie opisu do Rysunku 12. W tym opisie Doktorantka wspomina o „łącznikach”, które zostały wprowadzone pomiędzy fragmenty konstruowanych białek fuzyjnych pisząc na przykład: „Wariant pierwszy (w skrócie V1) fuzyjnej formy archealnej polimerazy DNA Pfu, o nazwie V1 Pfu-Sso7d-Sso7d, zawiera na C-końcu dwa białka Sso7d, połączone ze sobą łącznikami o różnych sekwencjach aminokwasowych (rysunek 12 V1)”. W dalszej części opisu Pani mgr inż. Joanna Nowicka podkreśla, że linkiery te odgrywają w konstrukcji białka dość istotną funkcję: „Wykorzystanie łączników pozwala na uniknięcie zawady sterycznej w białku fuzyjnym, która mogłaby zaburzyć odpowiednie oddziaływanie z DNA oraz jego amplifikację przez polimerazę DNA. Zastosowanie różnych łączników zapewnia uzyskanie rekombinowanych plazmidów DNA w prawidłowej konfiguracji, tak jak przedstawiono to na rysunku nr 13.”. Natomiast w opisie brak jakichkolwiek informacji odnośnie sekwencji aminokwasowych tych łączników/linkerów. Bardzo szczegółowe i wyczerpujące informacje przedstawiono natomiast w dyskusji (strony 155 i 156), uważam, że przynajmniej skrócona informacja powinna znaleźć się w opisie do Rysunku 12. Poza tym nie do końca rozumiem co oznaczają elementy w białych prostokątach – domyślam się, że chodzi tu o sekwencje starterów, z Tabeli 9, ale należało to wyraźnie napisać. Tyma bardziej, że na Rysunku przedstawiono tylko nazwy starterów składające się liter F (forward) lub R (reverse) i kolejnej cyfry – taki zapis tylko fragmentarycznie odpowiada nazwom starterów przedstawionym w Tabeli 9. Ponadto w Tabeli jest 15 starterów a na schemacie jest ich 12.
11. Strona 106 – w sformułowaniu „... dodatkowym łącznikiem o długości 18 nukleotydów oraz sekwencji komplementarnych do 11 początkowych genów kodujących N-koniec referencyjnej polimerazy Pfu-Sso7d...” chodzi oczywiście o 11 początkowych nukleotydów.
12. Strona 119 – w opisie pomiaru stężenia białka występuje pewna nieścisłość w przypadku korzystania z spektrofotometru NanoDrop nie stosuje się kuwet.
13. O ile dobrze rozumiem całą charakterystykę właściwości enzymów przeprowadzono z wykorzystaniem preparatów białek przygotowanych w jednej szarzy produkcyjnej. Uważam, że należałoby potwierdzić zaobserwowane różnice we właściwościach kolejnych wariantów polimerazy (nawet wybrane cechy), w badaniach z wykorzystaniem preparatów białek otrzymanych w jeszcze dwóch lub trzech szarzach produkcyjnych. W ten sposób można by wyeliminować wpływ niezamierzonych i nieprzewidzianych czynników związanych z procedurami produkcji i oczyszczania na właściwości biologiczne enzymu otrzymanego w konkretnej szarzy produkcyjnej.

### Opis Dorobku Doktorantki

Dotychczasowy dorobek Doktorantki obejmuje dwie publikacje w International Journal of Molecular Sciences, które jest renomowanym czasopismem naukowym o wysokiej wartości współczynnika IF= 5,6 oraz cztery doniesienia konferencyjne. Osiągnięcia te nie są bezpośrednio związane z tematyką pracy doktorskiej, ale potwierdzają duże zaangażowanie Doktorantki w działalność naukową Katedry, w której miała możliwość pracować. Na uwagę zasługuje fakt, że Pani mgr inż. Joanna Nowicka brała udział w realizacji trzech projektów naukowych, w dwóch z nich pełniła funkcję kierownika, jeden z projektów bezpośrednio dotyczył pracy doktorskiej.

Chciałbym, aby w trakcie obrony Doktorantka przekazała krótką informację czy w oparciu o uzyskane wyniki planowane jest przygotowanie publikacji lub patentu. Należy także zaznaczyć, że poprzez osobę promotora pomocniczego Pana dr inż. Kasjana Szemiako praca była wykonywana we współpracy z jednostką, która świadczy usługi komercyjne z zakresu biologii i diagnostyki molekularnej – Laboratorium Genetyczne Zwierząt GeneVet Sp. z o. o.. Czy w związku z tym są planowane jakieś działania mające na celu komercjalizację wyników? – np. produkcja i sprzedaż uzyskanych enzymów i/lub ich wykorzystanie w diagnostyce molekularnej opartej na reakcji PCR.

### Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Nowickiej pt.: „Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowanie fuzyjnych form archealnej polimerazy DNA” jest oryginalną, cenną zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym, rzetelnie i starannie przygotowaną pracą naukową, która spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim - określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U.2018 poz. 1668 z póź. zm). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr. inż. Joanny Nowickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

*dr hab. inż. Piotr Szweda, prof. PG*

*Piotr Szweda*

**POLITECHNIKA GDAŃSKA**  
**WYDZIAŁ CHEMICZNY**  
Katedra Technologii Leków i Biochemii  
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
tel. 58 347 18 06, faks 58 347 11 44  
NIP 584-020-35-83 REGON 000001620