



# POLITECHNIKA GDAŃSKA

Prof. dr hab. inż. Paweł Sachadyn  
Laboratorium Biotechnologii Regeneracyjnej  
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej  
ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk  
email: psach@pg.edu.pl, tel. 58 347 2671

Gdańsk, 12 września 2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Aliakseia Papkova pt. „Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu katalitycznego oraz wiążącego kofaktor”**

Rozprawa doktorska mgr. Aliakseia Papkova zatytułowana „Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu katalitycznego oraz wiążącego kofaktor” została wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora Prof. dr hab. Piotra Skowrona oraz promotora pomocniczego dr inż. Joanny Jeżewskiej-Frąckowiak. Dysertacja p. Aliakseia Papkova przedstawia wyniki badań eksperymentalnych, których celem była relaksacja endonukleazowej specyficzności substratowej endonukleazo-metylotransferazy TthHB27I z *Thermus sp.*, czyli uzyskanie tzw. aktywności „star” pozwalającej na efektywną fragmentację DNA. Fragmentacja DNA jest niezbędna do przygotowania reprezentatywnych bibliotek genomowych, głównie do sekwencjonowania. Alternatywą dla metod fizycznych, sonikacji i nebulizacji, są metody enzymatyczne. Pośród tysięcy scharakteryzowanych endonukleaz restrykcyjnych większość rozpoznaje sekwencje cztero i sześcionukleotydowe, a jedynie trzy CviII, SetI i FaeI, sekwencje krótsze niż czteronukleotydowe. Dlatego podejmowane są próby „nauczenia” endonukleaz restrykcyjnych częstszego trawienia DNA. Zespół prof. Skowrona ma w tej dziedzinie znaczące osiągnięcia, a praca p. Papkova reprezentuje istotną część tego kierunku badań. Doktorant podjął próbę zmniejszenia specyficzności substratowej TthHB27I metodą mutagenyzy ukierunkowanej przez modyfikacje motywów odpowiedzialnych za wiązanie S-adenylozometioniny (DPACGSG na DPAVGTG) i motyw katalityczny metylotransferazy (NPPW na NPPY). Ponieważ podejście z użyciem inżynierii genetycznej nie dało pożądanych efektów, Doktorant przeprowadził optymalizację warunków reakcji enzymu TthHB27I w kierunku obniżenia specyficzności substratowej, co pozwoliło na skrócenia sekwencji rozpoznania TthHB27I (CAARCA) z 6 do około 3 nukleotydów.

Manuskrypt dysertacji p. Aliakseia Papkova liczy 132 strony. Praca ma typowy układ rozpraw doktorskich. Obejmuje rozdziały wstęp (35 stron), materiały i metody (31 stron), wyniki i dyskusja (44 strony); ponadto zawiera spis treści, wykaz skrótów, cel pracy, streszczenia w języku polskim i angielskim, podsumowanie i bibliografię złożoną z 88 pozycji literaturowych. Autor zamieścił w manuskrypcie 9 tabel i 40, w większości oryginalnych, rysunków.

Rozdział „Wstęp teoretyczny” składa się z wprowadzenia o globalnym znaczeniu mikroorganizmów i czterech podrozdziałów zatytułowanych „Genomika”, „Metagenomika”, „Biblioteki genomowe”, „Endonukleazy restrykcyjne” (ten ostatni w mojej opinii szczególnie interesujący). Wszystkie części wstępu zawierają wartościowe informacje i ciekawe opinie Autora, ale uważam, że korzystniejsze byłoby skupienie na bibliotekach genomowych i endonukleazach restrykcyjnych, jako wyraźnie powiązanych z tematem pracy. Sądzę, że uzasadnione byłoby także poszerzenie tych podrozdziałów. Przydatne byłyby zwłaszcza informacje o wadach i zaletach fragmentacji enzymatycznej DNA w przygotowaniu bibliotek genomowych, ponieważ celem pracy było opracowanie narzędzia do takich aplikacji. Uwaga, że złożoność COVID-19 jako tematu badawczego może wywoływać poczucie niepokoju w społeczeństwie (s. 14) świadczy o tym, że Autor jako naukowiec nie ogranicza się do aspektów technicznych, co jest godne uznania. Z drugiej strony uważam, że takie dygresje nie służą dysertacji doktorskiej, która powinna koncentrować się na temacie pracy. Opinia, że odkrycie nukleiny przez Mieschera opublikowane w 1871 stanowi początek rozwoju genomiki jest ryzykowna. Sama izolacja nukleiny, bez powiązania tej substancji z genetyką nie wydaje się istotna dla powstania genomiki.

Rozdział „Materiały i metody” zawiera starannie wykonane zestawienie wykorzystywanych odczynników, materiałów, aparatury oraz wyczerpujące opisy stosowanych protokołów laboratoryjnych.

Kolejny rozdział dysertacji przedstawia wyniki badań w połączeniu z dyskusją. Ten rozdział w sposób wyczerpujący, a jednocześnie klarowny prezentuje szereg niezwykle pracochłonnych i perfekcyjnie wykonanych eksperymentów. Autor opisuje kolejne etapy swojej pracy: konstrukcję trzech zmodyfikowanych wariantów genów TthHB27I metodą mutagenезы ukierunkowanej (z mutacją w motywie wiązania SAM, w motywie katalitycznym metylotransferazy i w obydwu tych motywach), nadprodukcję i oczyszczanie enzymu natywnego i jego trzech zmodyfikowanych wariantów, charakterystykę aktywności endonukleazowej enzymów w obecności 5 kofaktorów allosterycznych (SAM - S-adezylometionina, SIN - sinefungina, SAC - S-adenozyl-L-cysteina, SAH - S-adenozyl-L-homocysteina, ATP), 7 jonów metali dwuwartościowych ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ), szeregu stężeń  $MnSO_4$ , miareczkowanie aktywności endonukleazowej zmutowanych wariantów TthHB27I przy 10 stosunkach molowych enzymu do miejsc trawienia w DNA (od 16:1 do 0,03:1) bez kofaktora, w obecności SAM i w obecności SIN, miareczkowanie aktywności metylotransferazowej w tym samym zakresie stosunków molowych. Na podstawie tej serii eksperymentów Doktorant ustalił, że wariant TthHB27I-NPPY, czyli z mutacją w motywie katalitycznym metylotransferazy utracił tę aktywność, wariant TthHB27I-DPAVGTG czyli z modyfikacją w motywie wiązania SAM wykazuje, w przeciwieństwie TthHB27I-NPPY i natywnego TthHB27I aktywność endonukleazową nawet bez stymulacji SAM i SIN. Jednak w ocenie Doktoranta modyfikacje genetyczne nie pozwoliły na uzyskanie enzymu o odpowiednio wysokiej aktywności niespecyficznej „star” i dlatego przeprowadził kolejną serię doświadczeń zmierzających do uzyskania gęstego trawienia DNA przez natywny TthHB27I poprzez modyfikację warunków reakcji. W tym celu Doktorant wykorzystał 6 stężeń DMSO (od 5 do 30%) bez dodatku kofaktorów allosterycznych lub z jednym z 5

kofaktorów wspomnianych wyżej. Następnie podobną analizę wykonał dla optymalnego stężenia 25% DMSO, ale dla trzech różnych substratów, czyli przygotowanymi przez siebie produktami PCR 1789 pz z dwoma miejscami rozpoznania dla TthHB27I w formie niezmetylowanej i zmetylowanej (przez TthHB27I) oraz 1850 pz bez miejsc rozpoznania TthHB27I. Po ustaleniu korzystnych dla relaksacji aktywności endonukleazowej warunków, czyli użyciu TthHB27I w 25% DMSO z dodatkiem SAM lub SIN, Doktorant przygotował biblioteki z produktów trawienia DNA faga  $\lambda$ . Sekwencjonowanie kilkuset uzyskanych klonów wykazało, że w warunkach relaksacji nastąpiła redukcja średniej długości sekwencji rozpoznania do około 3 nukleotydów. Wreszcie Doktorant ocenił wpływ czasu, temperatury reakcji i ilości enzymu na częściowe trawienie DNA faga  $\lambda$  i DNA *E. coli*. Wyniki trawień DNA w różnych warunkach znakomicie zaplanowanych doświadczeń zostały pokazane na zdjęciach z niezwykłą starannością wykonanych elektroforez z użyciem 41 żeli agarozowych, co obrazuje imponujący zakres wykonanej pracy doświadczalnej. Należy podkreślić, że na szczególne uznanie zasługuje tu nie tylko liczba, ale trudna do uzyskania perfekcja w wykonaniu doświadczeń i przejrzystość w oznaczeniu przedstawionych żeli elektroforetycznych. Opis wyników jest przy tym zwarty i jasny, a dobrze uzasadnione wnioski ujęte zwięźle. Jednak w prezentacja tak licznych rezultatów zwykle pozostawia miejsce na drobne udoskonalenia:

- s. 76 „Mutageneza ukierunkowana ..., to precyzyjna metoda wprowadzania celowych mutacji w sekwencji DNA za pomocą oligodeoksyrybonukleotydów.” Nie wszystkie metody mutagenezy ukierunkowanej są oparte na użyciu oligodeoksyrybonukleotydów.
- Na s. 80 Autor wspomina o pojawieniu się w hodowlach bakteryjnych po indukcji ekspresji „charakterystycznych kłaczków”. Taki efekt warto udokumentować fotograficznie.
- Na s. 90 autor zwraca uwagę że TthHB27I-NPPY i TthHB27I-DPAVGTG/NPPY cechuje niższa aktywność egzonukleazowa niż dla wariantu i TthHB27I-DPAVGTG oraz enzymu natywnego w reakcjach bez dodatku efektorów allosterycznych, jednak niewielkie ilości produktów trawienia są obecne zarówno TthHB27I-DPAVGTG/NPPY, jak i enzymu natywnego (Rys 26, panele C i D, ścieżki nr 1).
- Na s. 86 Autor pisze o identycznych wynikach oczyszczania białka, a na s. 100 o identycznych wynikach oceny aktywności endonukleazowej w żelach agarozowych. Lepiej użyć tu określenia analogiczne lub podobne, identyczne wyniki tego rodzaju doświadczeń są niespotykane.
- Na s. 102 podpis pod Rys 32 brzmi „Miareczkowanie jednostek aktywności MTazy TthHB27I i jej wariantów”, ale na rysunku zestawiono jedynie wyniki dla 3 wariantów zmodyfikowanych.
- Na s. 105 Autor ocenia, że na rys. 33A „przy wyższych stężeniach DMSO dodanych do reakcji trawienia DNA zaobserwowano wzrost liczby fragmentów trawienia”. Myślę, że można podjąć próbę kwantyfikacji poprzez policzenie widocznych prążków.
- s. 106 „w przypadku TaqII i TspGWI efekt ten widoczny był jedynie przy zastosowaniu SIN”- wskazane byłoby odwołanie do źródła.
- s. 117-118 „Dla wszystkich trzech opracowanych przez zespół prof. Skowrona "ultra-częstych nożyc molekularnych" teoretyczna długość miejsca rozpoznawania aktywności "star" zależnej od kofaktora/analogu wynosi około 3-pz, niezależnie od tego, czy zrelaksowane miejsca trawienia miały długość 5-pz (TspGWI), 6-pz (TaqII) czy były zdegenerowane w jednym miejscu 6-pz (TthHB27I). We wszystkich przypadkach niezrelaksowanych

enzymów z rodziny *Thermus*, zachowano odległość rozcięcia wynoszącą 11/9 nt w miejscach aktywności "star" zależnej od kofaktora/analogu, co skutkuje powstaniem fragmentów DNA z 2-nt wydłużonymi końcami lepkiemi 3'. Dla TaqII/SIN wykazano, że po wypełnieniu końców, mieszanina częściowego trawienia nadaje się do przygotowania eukariotycznej biblioteki genomowej" – również wskazane byłoby odwołanie do źródła

- s. 108 „Porównanie wzorów trawienia między niezmodyfikowanym a metylowanym DNA nie wykazało istotnych różnic, co sugeruje, że metylacja miejsc trawienia przez MTazę TthHB27I nie wpływa na proces trawienia (Rys. 34 A, ścieżki 4, 6 oraz Rys. 34. Potwierdzenie tego faktu stanowi również obserwacja degradacji fragmentu PCR o długości 1850 pz (Rys. 34 C, ścieżki 4, 6).” Kolejna obserwacja nie tyle potwierdza obserwację poprzednią, co obserwowaną zależność.

Ponadto w opisie wyników mutagenyzy i oczyszczania białek warto byłoby zrezygnować ze zbędnych w tych rozdziałach szczegółów metodologicznych. Rys. 26-34 złożone są z kilku paneli rozmieszczonych na kilku stronach. Zmniejszenie fotografii pozwoliłoby uniknąć tamania rysunków między stronami, co bardzo ułatwiłoby analizę wyników.

Mam też uwagi dotyczące streszczenia i podsumowania. Streszczenie dobrze wyjaśnia założenia pracy, ale powinno też zawierać omówienie kluczowych wyników. W podsumowaniu warto odnieść się do wyników prac innych niż własny zespół naukowych.

Poprawność językowa i terminologiczna oraz poziom edytorski pracy są zadowalające, chociaż można dostrzec pewną liczbę drobnych potknięć, z których ważniejsze odnotowuję poniżej:

- s. 15 „z zastosowaniem metody Sangera opartej na kapilarach” – opartej na użyciu elektroforezy kapilarnej
- s. 16 „Znaczący wzrost danych wyjściowych był spowodowany zasadami nanotechnologii i innowacjami”
- s. 29 „obdarzonych dużym błędem” – obarczonych
- s. 41 „Obecnie zidentyfikowano i scharakteryzowano tysiące enzymów restrykcyjnych” – dotychczas
- s. 60 „Składniki podłoży i pożywek pochodziły od firmy BTL z Polski”
- s. 83 - oznaczenie miary objętości litr wielką literą „L” – W ten wygodny sposób można oznaczyć litr w amerykańskim angielskim, ale nie w języku polskim.
- s. 84 „pełni rolę stepu negatywnego” - kroku
- s. 87 „Wszystkie mieszaniny reakcyjne miały objętość 50 µl i przeprowadzono je w termocyklerze” W termocyklerze przeprowadzono reakcje.
- s. 100 „Kolejną właściwością jaką zbadano było oznaczenie aktywności metylotransferazy” Zbadaną właściwością była aktywność metylotransferazy.
- s. 110 „ustawiono dwie mieszaniny ligacyjne” – przygotowano
- s. 120 „enzym o większej aktywności niż wersja naturalna” – niż enzym natywny

Dorobek naukowy doktoranta obejmuje 3 postery konferencyjne i 4 artykuły w czasopismach z listy filadelfijskiej, w tym trzy powiązane z tematyką rozprawy doktorskiej, z których dwa opublikowano w bardzo dobrych czasopismach biotechnologicznych, *BMC Genomics* i *Journal of Biotechnology*.

Podczas lektury dysertacji doktorskiej p. Papkova nasunęły mi się dwa powiązane ze sobą pytania, których dyskusja byłaby cenna podczas obrony rozprawy:

1. Jakie są wady i zalety metod enzymatycznych fragmentacji DNA w porównaniu z metodami fizycznymi?
2. W jakich wypadkach w konstrukcji bibliotek korzystniejsze jest stosowanie enzymatycznych metod fragmentacji DNA?

Podniesione drobne zastrzeżenia nie pomniejszają mojej jednoznacznie pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej i wyjątkowo wysokiej oceny projektu eksperymentów, ich wykonania i dokumentacji.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca mgr. Aliakseia Papkova pt. „Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu katalitycznego oraz wiążącego kofaktor” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule naukowym. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. Aliakseia Papkova do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

