



Dr hab.n.med. Magdalena Górską-Ponikowska , prof. Uczelni

Gdańsk, 20.09.2023 r.

Katedra i Zakład Chemii Medycznej

Wydział Lekarski

Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Aliakseia Papkov

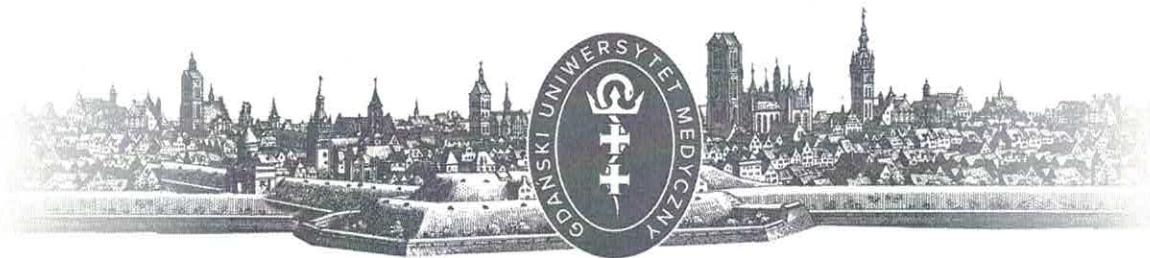
pod tytułem

**„Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy
restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu
katalitycznego oraz wiążącego kofaktor”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr **Aliakseia Papkov** pod tytułem „*Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu katalitycznego oraz wiążącego kofaktor*” została wykonana pod promotorstwem prof. dr hab. Piotra Skowrona, Kierownika Katedry Biotechnologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy doktorskiej jest dr inż. Joanna Jeżewska-Fraćkowiak również z Uniwersytetu Gdańskiego.

Rozprawa doktorska Pana mgr Aliakseia Papkov liczy 132 numerowanych stron i posiada typowy układ dla pracy doktorskiej. Praca doktorska została podzielona na następujące rozdziały:

I. Cel pracy, II. Wstęp teoretyczny z podrozdziałami Genomika, Metagenomika, Biblioteki Genomowe oraz Endonukleazy Restrykcyjne III. Materiały i metody, IV. Wyniki i dyskusja, V. Podsumowanie, VI. Wykaz skrótów stosowanych w pracy oraz VII. Literatura. Tekst pracy poprzedzony jest spisem treści oraz streszczeniami w języku polskim oraz angielskim.



Bibliografia obejmuje 88 pozycji literaturowych. Praca doktorska jest ilustrowana przez 40 rycin i 10 tabel. Niestety, zabrakło jednak spisu rycin oraz tabel.

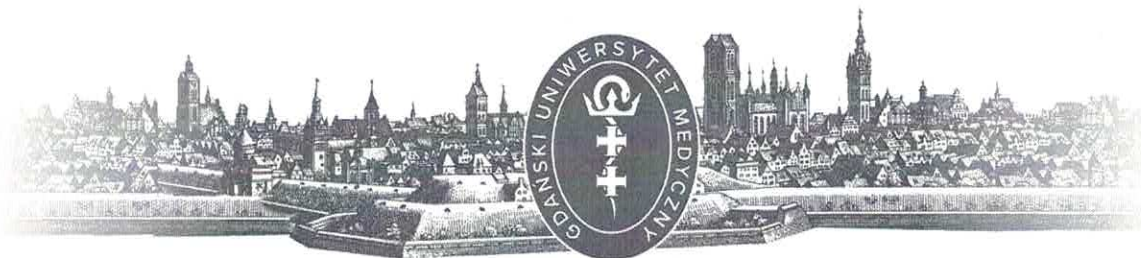
Jak wskazano w streszczeniu pracy, badania prowadzone przez Doktoranta są kontynuacją badań zespołu Promotora niniejszej pracy, prof. dr hab. Piotra Skowrona, nad aktywnością endonukleaz restrykcyjnych podtypu IIS/IIG/IIC. Badania prowadzone przez zespół prof. dr hab. Piotra Skowrona wykazały zmianę specyficzności substratowej endonukleaz restrykcyjnych TspGWI i TaqII pod wpływem sinefunginy, czego nie zaobserwowano przy zastosowaniu prekursora związku – kofaktora S-adenozylometioniny (SAM).

Założeniem, które Doktorant weryfikuje w ramach swojej pracy doktorskiej, jest zmiana specyficzności restrykcyjnej endonukleazy TthHB27I w wyniku zmian w sekwencji aminokwasowej w obrębie kluczowych dla aktywności enzymu motywów i uzyskanie zmodyfikowanych tzw. „nożyczek molekularnych”. Opracowywanie nowych systemów enzymatycznych, leków biologicznych przy użyciu inżynierii genetycznej staje się aktualnie coraz częściej wykorzystywanym narzędziem. Wciąż poszukiwane są nowe opcje terapeutyczne i ich kombinacje mające na celu zwiększenie efektywności terapii. Stąd, opracowywanie nowych systemów enzymatycznych w medycynie oraz molekularnych narzędzi konstrukcji nowych leków ma kluczowe znaczenie z poznawczego i praktycznego punktu widzenia. Z wyżej wymienionych powodów wybór tego tematu badań przez Doktoranta uważam za bardzo trafny i cenny.

Niestety, w obu wersjach językowych streszczenia Doktorant opisuje cele pracy i metodykę w czasie przyszłym, co utrudnia wprowadzenie w zakres pracy badawczej. Prawdopodobnie wynika to z pozostałości bariery językowej, jakkolwiek, Doktorant ogólnie radzi sobie bardzo dobrze pisząc rozprawę w języku polskim, a dalsza lektura rozjaśnia wszelkie wątpliwości Recenzenta.

Następstwem powyższego rozdziału są postawione przez Doktoranta hipoteza badawcza i cel pracy. Doktorant postawił sobie trzy szczegółowe cele badawcze:

- 1) uzyskanie nowych wariantów enzymu TthHB27I, poprzez wprowadzenie mutacji w obrębie dwóch motywów: motywie wiążącym S-adenozylometioninę oraz motywie katalitycznym metylacji, tak by były one identyczne jak u TspGWI – innej endonukleazo-metylotransferazy, która w obecności odpowiednich kofaktorów wykazuje aktywność zrelaksowanego cięcia DNA tzw. aktywność „affinity star” odkrytą i zdefiniowaną we wcześniejszych pracach zespołu prof. Piotra Skowrona;
- 2) opracowanie odpowiednich warunków reakcji, które spowodują u uzyskanych wariantów endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I relaksację specyficzności substratowej, objawiającej się



w postaci rozpoznawania krótszych niż standardowo sekwencji DNA, a w konsekwencji częstszemu trawieniu substratowego DNA;

- 3) scharakteryzowanie właściwości biochemicznych uzyskanych wariantów TthHB271 ze zmienionymi motywami katalitycznymi

Zarówno hipoteza badawcza, jak i cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie i odzwierciedlają postawione przez Doktoranta zadania do wykonania w ramach zaplanowanych badań. We Wstępie teoretycznym liczącym 34 stron Doktorant logicznie oraz konsekwentnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Opisuje etapy rozwoju genomiki oraz jej narzędzia tj. rodzaje sekwencjonowania i mikromacierze DNA. Analogicznie, wprowadza w rodzaje Metagenomiki, konsekwentnie przechodząc do zagadnień z obszaru biblioteki genomowej i endonukleaz restrykcyjnych.

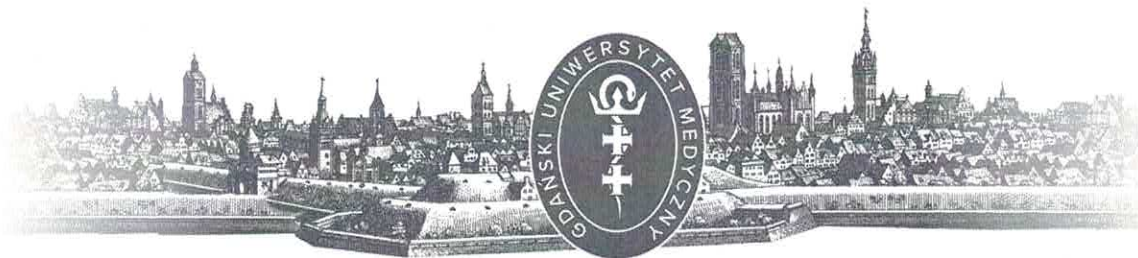
Przy tej części pracy doktorskiej proszę Doktoranta o doprecyzowanie i wyjaśnienie kilku kwestii:

- 1) Na stronie 31, rysunku nr 6, Doktorant opisuje podział metagenomiki na funkcjonalną i sekwencyjną przedstawiając przykład mikrobioty.
- 2) Na stronie 44, Doktorant pisze (...) „nasz zespół opracował alternatywne podejście, wykorzystujące TspGWI i TaqII Reazy-MTazy, które naturalnie rozpoznają stosunkowo długie 5–6-pz sekwencje DNA, ale w połączeniu z analogiem kofaktora SAM – SIN tną DNA znacznie częściej. Ten efekt można dodatkowo wzmocnić przez połączenie SIN z DMSO, co sprawia, że TspGWI i TaqII stają się często tnącymi enzymami, rozpoznającymi sekwencje o długości około 3 pz [Zylicz-Stachula i in., 2002; Zylicz-Stachula i in., 2011]”.

Prosiłabym tutaj o rozwinięcie tematu pod kątem zastosowania tych technik w medycynie i przemyśle.

Należy podkreślić, że informacje we „Wstępie teoretycznym” są przedstawione w sposób klarowny ułatwiający czytelnikowi zrozumienie tematyki badań Doktoranta. Treść tego rozdziału wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne i znajomość tematu obszaru badań. Zrozumienie opisywanych przez Doktoranta zagadnień niewątpliwie ułatwia przejrzyste opracowanie graficzne. Omawiane zagadnienia zostały zobrazowane przez 10 rycin.

Kolejny rozdział pracy, „Materiały i Metody”, jest napisany przejrzysto i starannie. Doktorant dokładnie opisał użyte materiały, włączając stosowaną aparaturę. Następnie, przedstawił materiał badawczy oraz czytelnie opisał procedury izolowania, oczyszczania, analizy DNA. Na uznanie zasługuje fakt, że Doktorant stosował i dokładnie opisał stosowane protokoły różnorodnych metod inżynierii: od hodowli wybranych rekombinowanych szczepów *Escherichia coli* w celu izolowania DNA i ekspresji



genetycznej, poprzez izolowanie rekombinowanych białek i ich badania biochemiczne, co niewątpliwie zwiększa wartość merytoryczną recenzowanej rozprawy doktorskiej.

W rozdziale „Materiały i Metody” zawarto opis następujących procedur badawczych: hodowle bakteryjne, transformacja bakterii plazmidowym DNA - elektroporacja, elektroforeza SDS-PAGE białek, liza komórek bakteryjnych, wytrącanie kwasów nukleinowych za pomocą polietylenoiminy, Ultrafiltracja, Test na obecność endonukleazy restrykcyjnej we frakcjach chromatograficznych, Chromatografia jonowymienna i powinowactwa, Oznaczanie stężenia białka w preparacie – pomiar densytometryczny, Badania właściwości biochemicznych enzymów, Badanie wpływu DMSO na aktywność „star” endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I.

Podsumowując, rozdział „Materiały i Metody” w sposób skrupulatny i wyczerpujący opisuje całość zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentów, pozwalając na odtworzenie warunków i weryfikację uzyskanych wyników przez innych badaczy. Zdaniem Recenzenta wybór oraz zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod i technik badawczych z dziedzin genetyki, biologii molekularnej, biologii komórki oraz biochemii jest imponujący i świadczy o ogromie poświęconej pracy oraz dużym potencjale naukowym Doktoranta. Jedyną moją uwagą do tej części rozprawy doktorskiej jest brak opisu analizy statystycznej otrzymanych wyników badań.

Rozdział „Wyniki i dyskusja” przedstawiony został na 55 stronach, zobrazowany przez 33 ryciny oraz podzielony na 5 głównych punktów dotyczących kolejno: „Mutageniza kierunkowa genu *syn-tthHB27IRM*” (1); „Nadprodukcja i oczyszczanie wariantów TthHB27I” (2); „Właściwości biochemiczne uzyskanych wariantów enzymu TthHB27I” (3); „Optymalizacja warunków wywołujących relaksację specyficzności enzymatycznej TthHB27” (4); „Wpływ obecności/braku miejsc rozpoznawania sekwencji homologicznej w substratowym DNA na aktywność endonukleolityczną enzymu TthHB27I związaną z obecnością kofaktora/analogu” (5).

W pierwszym punkcie rozdziału „Wyniki i dyskusja” Doktorant charakteryzuje warunki przeprowadzenia mutagenyzy miejscowo-specyficznej w syntetycznym, zoptymalizowanym genie *syn-tthHB27IRM* oraz przedstawia analizy restrykcyjne otrzymanych klonów. W celu potwierdzenia obecności pożądaných mutacji w wytypowanych klonach, przeprowadził kolejno analizę sekwencyjną, która potwierdziła obecność poprawnych mutacji we wszystkich wyselekcjonowanych klonach wariantu TthHB27I-NPPY. Wybrane pozytywne klony Doktorant wykorzystał w kolejnym etapie badań do nadprodukcji wariantów TthHB27I w komórkach ekspresyjnego szczepu *E. coli*.

Kolejno, Doktorant przeprowadził eksperymenty prowadzące do nadekspresji genów kodujących wszystkie trzy warianty REazy TthHB27I: TthHB27I-DPAVGTG, TthHB27I-DPAVGTG/NPPY oraz TthHB27I-NPPY. Dla każdego wariantu przeprowadzono 2 hodowle – jedną kontrolną oraz jedną właściwą. Co ciekawe, hodowle *E.coli* niosących plazmidy pET21d(+)-*syn-tthHB27I-NPPY* oraz pET21d(+)-*syn-tthHB27I-DPAVGTG/NPPY* po trzech godzinach od indukcji ekspresji genów zaczynały lizować, co najprawdopodobniej świadczy o toksycznym charakterze powstającego białka REazy wobec



komórek gospodarza *E. coli*. Jak wskazuje Doktorant, w przeciwieństwie do wymienionych dwóch, hodowla bakterii niosących plazmid pET21d(+)-syn-tthHB27I-DPAVGTG przez cały okres prowadzenia hodowli nie lizowała. Tu pytanie: czy Doktorant ma hipotezę dlaczego?

W kolejnym etapie Doktorant oczyścił białka oraz wykonał analizę densytometryczną, ustalając stężenie białka w badanych preparatach TthHB27I-DPAVGTG, TthHB27I-NPPY oraz TthHB27I-DPAVGTG/NPPY, a następnie rozpoczął analizy biochemiczne.

Moja drobna uwaga dotyczy ryciny nr 25 oraz wykonanej analizy densytometrycznej – warto byłoby przedstawić krzywą wzorcową oraz wykonać analizę statystyczną otrzymanych wyników z trzech niezależnych eksperymentów. W tym miejscu prosilibym Doktoranta o odpowiedź, jaką inną metodą oprócz zastosowanej, można zmierzyć zawartość białka w badanej próbce.

Doktorant kolejno skupił się na przeprowadzeniu szeregu reakcji enzymatycznych mających na celu określenie właściwości biochemicznych wariantów REazo-MTazy TthHB27I. W pierwszej kolejności zbadał wpływ kofaktora S-adenozylometioniny SAM, jego analogów sinefunginy, S-adenozyllocysteiny, S-adenozylhomocysteiny oraz ATP na aktywność endonukleolityczną badanych białek. Analizując otrzymane wyniki badań Doktorant wywnioskował, że aktywność endonukleolityczna wszystkich trzech wariantów TthHB27I jest stymulowana przez dodatek SAM lub sinefunginy do mieszaniny reakcyjnej. Podczas, gdy S-adenozyllocysteina, S-adenozylhomocysteina oraz ATP nie mają wpływu na aktywność badanych endonukleaz restrykcyjnych.

W tym miejscu chciałabym poprosić Doktoranta o doprecyzowanie poniższych aspektów dotyczących punktu 4.3:

- 1) Przy rycinie nr 26 brakuje hipotezy Doktoranta, dlaczego kofaktor S-adenozylometionina może być w reakcji trawienia DNA funkcjonalnie zastąpiony przez jego strukturalny analog – sinefunginę, a działania tego nie zaobserwowano w przypadku innych analogów, nawet bardziej zbliżonych chemicznie do kofaktora – czyli S-adenozyllocysteiny, S-adenozylhomocysteiny, ATP.
- 2) Przy rycinie nr 27 - jony metali powinny być numerowane w opisie pod figurą dla ułatwienia lokalizacji odpowiadających im ścieżek na żelu, skoro są tam oznaczone cyframi. Ponadto, brakuje wyjaśnienia Doktoranta, dlaczego jedynie jony manganu tak silnie relaksują specyficzność substratową wariantów mutacyjnych metylotransferazo-endonukleazy restrykcyjne TthHB27I, zamieniając je w niemal niespecyficzne endonukleazy.



- 3) W pracy na stronie 94 znalazła się interpretacja potencjalnych zastosowań relaksacji specyficzności substratowej wariantów mutacyjnych TthHB271 przez jony manganu, cyt. „Niestety relaksacja badanych REaz w podanych warunkach jest na tyle silna, że ciężko byłoby ją kontrolować. Tak wysoki stopień degradacji DNA niestety nie jest wskazany w przypadku przygotowywania bibliotek genomowych. Mogą one natomiast znaleźć inne zastosowanie, chociażby jako alternatywa dla innych nukleaz stosowanych do degradacji DNA.”. Trudno się całkowicie zgodzić z tym twierdzeniem, gdyż aktywność enzymów można regulować na szereg sposobów. W przypadku termostabilnych i termofilnych wariantów mutacyjnych TthHB271 najprostszym sposobem kontroli trawienia DNA w obecności jonów manganu byłoby obniżenie temperatury reakcji lub obniżenie stężenia enzymów lub skrócenie czasu reakcji. Czy Doktorant testował tego rodzaju zmianę warunków, aby doprowadzić do zyskania większych fragmentów DNA w wyniku trawienia DNA w obecności jonów manganu?

W kolejnym etapie pracy, z uwagi na brak oczekiwanych rezultatów w postaci nowego wariantu TthHB271 charakteryzującego się aktywnością „affinity star”, Doktorant podjął próbę uzyskania takiej aktywności optymalizując warunki wywołujące relaksację specyficzności enzymatycznej TthHB271. Co ciekawe, wykazał, że dodatek do mieszaniny reakcyjnej dimetylosulfotlenku (DMSO) w zależności od stężenia powoduje relaksację specyficzności enzymu, podobną do klasycznej aktywności "star". Dodatkowo, Doktorant przeprowadził ocenę potencjalnego efektu synergistycznego między DMSO a kofaktorem SAM, i jego poprzednio użytych analogów oraz ATP. Wykazał, wzmocnioną relaksację specyficzności poprzez zastosowanie SAM oraz sinefunginy łącznie z DMSO. Tego efektu Doktorant nie zaobserwował przy S-adenozyllocysteiny, S-adenozylhomocysteiny lub ATP.

W tym miejscu Recenzent prosi o wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów prowadzących do synergistycznego efektu na relaksację specyficzności enzymu po zastosowaniu DMSO wyłącznie z kofaktorem SAM i jego analogiem sinefunginą.

Kolejno, Doktorant podjął próbę oceny „Wpływu obecności/braku miejsc rozpoznawania sekwencji homologicznej w substratowym DNA na aktywność endonukleolityczną enzymu TthHB271 związaną z obecnością kofaktora/analogu”. Niestety, w tym i dalszej części sekcji „Wyników i dyskusji” brakuje numeracji. Następnie, Doktorant określił sekwencję rozpoznawaną przez TthHB271 oraz miejsca trawienia w warunkach aktywności "star" zależnej od SAM i jego analogu sinefunginy. Przebadał 153 klony z biblioteki TthHB271/DMSO/SAM i 139 klony z biblioteki TthHB271/DMSO/SIN. Doktorant przedstawił rozkład długości produktów trawienia na podstawie długości insertów obecnych w analizowanych klonach, wskazując, iż częściowe trawienia dominują w otrzymanej puli fragmentów DNA, co wskazuje na przydatność enzymu do kontrolowanych, częściowych trawień w celu konstrukcji bibliotek genomowych.



Główna uwaga Recenzenta do tej części wyników dotyczy braku analizy statystycznej, w szczególności przedstawienia odchylenia standardowego, przy rycinie nr 38 prezentującej rozkład długości insertów w wybranych do analizy sekwencyjnej klonach z biblioteki DNA λ wygenerowanej przez TthHB27I/DMSO/SAM oraz rozkład długości insertów w wybranych do analizy restrykcyjnej klonach z biblioteki DNA λ wygenerowanej przez TthHB27I/DMSO/SIN.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja” zwraca uwagę fakt, iż Doktorant rzetelnie i przejrzysto opisał otrzymane wyniki badań, natomiast, w bardzo niewielu miejscach skonfrontował je z dostępnymi danymi literaturowymi. Czy przyczyną jest ograniczona dostępność piśmiennictwa na podejmowany przez Doktoranta temat? Jeśli tak, to należałoby to jasno podkreślić na przykład we wstępie bądź podsumowaniu rozprawy doktorskiej.

W kolejnej części (5) rozprawy doktorskiej, Doktorant podsumowuje otrzymane wyniki badań wskazując na ich aplikacyjność. Rozprawę doktorską Doktorant kończy czterema wnioskami. Należy podkreślić, że wysunięte wnioski są odpowiedzią na cele szczegółowe pracy.

Zaprezentowana przez Doktoranta rozprawa doktorska w sposób logiczny i konsekwentny odzwierciedla kontekst badań i potwierdza dużą znajomość problematyki regulacji specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej. Należy zwrócić uwagę, że Doktorant zaznacza w odpowiednich miejscach nowatorskie aspekty swoich badań, przewagę technologiczną zastosowanych przez Niego narzędzi badawczych oraz ich potencjalne wykorzystanie w dziedzinie inżynierii genetycznej. Co warto podkreślić, Doktorant podchodzi krytycznie do otrzymanych wyników badań, optymalizując warunki eksperymentów i zastosowane techniki badawcze.

W swojej pracy doktorskiej Doktorant nie ustrzegł się jednak błędów edytorskich m.in. brak numeracji niektórych punktów, czy niekonsekwencja stosowania skrótów. Te uwagi jednak nie umniejszają bardzo wysokiej wartości naukowej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, zarówno merytoryczna jak i metodyczna strona rozprawy doktorskiej zasługuje na uznanie. Sugestie recenzenta wskazane w poszczególnych częściach recenzji, pozostawiam Doktorantowi do rozważenia przy ewentualnej publikacji wyników badań. Jednocześnie zaznaczam, iż moje uwagi nie umniejszają wartości poznawczej oraz klinicznej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska *Pana mgr Aliakseia Papkov* pod tytułem „*Zmiana specyficzności substratowej termostabilnej endonukleazy restrykcyjnej TthHB27I za pomocą inżynierii genetycznej motywu*”



katalitycznego oraz wiążącego kofaktor” spełnia w pełni wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Załącznik do obwieszczenia Marszałka Sejmu RP z dnia 02 grudnia 2014r. – Dz.U. poz. 1852).

Zwracam się zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr *Aliakseia Papkov* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
Magdalena Górka-Ponikowska
dr hab. Magdalena Górka-Ponikowska, prof. uczelni

Dr hab.n.med. Magdalena Górka-Ponikowska, prof. Uczelni