



Wrocław 17 września 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Klaudii Marlickiej

"Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych"

Techniki rekombinacyjne DNA są podstawą rozwoju współczesnej biotechnologii. Otrzymane takimi metodami białka o ulepszonych lub nowych właściwościach są odpowiedzią na potrzeby przemysłu, diagnostyki lub medycyny. Jednym z narzędzi używanych celem otrzymania takich polipeptydów jest zastosowanie konstruktów fuzyjnych. Pozyskane tą drogą cząsteczki zawierające dwa lub więcej elementów połączonych specyficznymi łącznikami. Takie białka wykazują często nieoczywiste cechy, niebędące prostą sumą własności budujących je domen. Możliwość budowy nowych białek składających się z polipeptydów uzyskanych z różnych organizmów w tym żyjących w ekstremalnych warunkach środowiskowych daje prawie nieograniczone możliwości kombinacji elementów składowych. Jedną z najlepszych metod identyfikacji materiału genetycznego w próbkach biologicznych jest polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR) lub jej pochodne (qPCR, RT-PCR). Klasycznie ta metoda wymaga odpowiedniej, precyzyjnej aparatury, co limituje jej zastosowanie w warunkach terenowych. Alternatywą dla klasycznej reakcji PCR jest amplifikacja izotermiczna, którą można wykonać praktycznie bez skomplikowanej aparatury. Powielanie kwasów nukleinowych za pomocą PCR jak i metodach izotermicznych jest wrażliwe na zanieczyszczenia występujące w materiale biologicznym. Z tego powodu poszukuje się nowych ulepszonych enzymów do amplifikacji DNA.

Wyniki przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Klaudii Marlickiej pt.: „Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych” są odpowiedzią na potrzebę opracowania nowych polimeraz do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych. Badania prowadzone przez doktorantkę zostały przeprowadzone w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej pod opieką doświadczonego w zakresie konstruowania nowych białek naukowca, dr. hab. inż. Marcina Olszewskiego, prof. PW.

Przedstawiona do recenzji praca jest obszerna, liczy aż 199 stron. Objętość pracy w głównej mierze wynika z ilości doświadczeń, które wykonała i opisała w rozprawie doktorantka. Dysertacja jest podzielona w tradycyjny sposób na rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Wnioski i dyskusja oraz Bibliografia. Ponadto praca zawiera: Streszczenia w języku polskim oraz angielskim, Podsumowanie, Wykaz skrótów, Spis rysunków, tabel oraz Załączniki.

Układ pracy jest logiczny i dobrze prowadzi czytelnika przez rozprawę. Bibliografia liczy 165 pozycji. W zdecydowanej większości autorka rozprawy cytuje prace opublikowane po roku 2000. Cytowania są adekwatne do treści pracy.

Rozdział Wstęp jest napisany bardzo dobrze. Autorka pracy wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z swoimi badaniami rozpoczynając od opisu generalnej charakterystyki polimeraz DNA omawiając ich budowę i aktywność katalityczną. Następnie doktorantka przedstawia polimerazę I DNA z *Bacillus subtilis*, (polimeraza Bsu) oraz polimerazę Phi29 z bakteriofaga Φ29, które są elementami otrzymanych w pracy konstruktów. Ponieważ celem badań jest otrzymanie nowych polimeraz do amplifikacji izotermicznej, w logiczny sposób, Pani mgr. inż. Klaudia Marlicka przechodzi do opisu procesu powielania DNA. Autorka opisuje polimerazową reakcję łańcuchową, jej modyfikacje oraz problemy związane z wpływem zanieczyszczeń na amplifikację DNA. W dalszej części rozdziału Wstęp znajduje się szeroki opis izotermicznych metod amplifikacji kwasów nukleinowych. Doktorantka przybliży czytelnikowi metody, które będzie używała w pracy raz białka planowane do wykorzystania w konstruktach fuzyjnych. Końcowe części wstępu zajmuje opis polimeraz fuzyjnych z naciskiem na poprawę parametrów pracy takich cząsteczek. Rozdział bardzo dobrze współgra z pozostałymi częściami pracy i jest w należyty sposób wzbogacony o ilustracje.

Cel pracy jest dobrze zdefiniowany. Odpowiada na realną potrzebę opracowania nowych wydajnych i odpornych na inhibitory polimeraz do reakcji izotermicznych. Przedstawione w rozprawie badania są zgodne z celem oraz tytułem pracy.

Metodyka jest dobrze dobrana do zaplanowanych badań, Doktorantka bardzo dobrze porusza się w swoim warsztacie badawczym. Problemy napotkane w trakcie realizacji pracy wynikają raczej ze skomplikowanej natury układów biologicznych a nie błędów warsztatowych. Opis metod badawczych jest szczegółowy i zasadniczo umożliwia odtworzenie przeprowadzonych prac lub wykonanie podobnych badań z użyciem analogicznych cząsteczek. Doktorantka użyła szerokiego wachlarza metod w swojej pracy: izolacje, trawienie, klonowanie DNA, izolacja RNA, transformacja i hodowle bakterii, nadprodukcja białek w systemach bakteryjnych, techniki chromatograficzne, analiza aktywności enzymatycznej, badanie oddziaływania białko:DNA, amplifikacja izotermiczna DNA.

Do najważniejszych wyników przedstawionych w pracy Pani mgr. inż. Klaudii Marlickiej zaliczam:

Zaprojektowanie oraz otrzymanie 28 konstruktów genetycznych polimeraz Bsu, Phi29 i białka wiążącego DNA - Gp32 oraz konstruktów fuzyjnych zawierających kombinację: Bsu lub Phi29 wraz białkami wiążącymi DNA: Gp32, NeqSSB Neq150 połączonych odpowiednimi linkerami z/lub bez metki His-taq. Poprawność otrzymanych konstruktów została zweryfikowana elektroforetycznie oraz poprzez sekwencjonowanie.

Nadprodukcję oraz oczyszczanie zaprojektowanych konstruktów w systemach bakteryjnych. W pierwszej kolejności doktorantka optymalizowała proces produkcji białek używając różnych szczepów oraz warunków hodowli a następnie oczyściła z użyciem różnych złożów chromatograficznych 25 z zaprojektowanych białek. Czystość preparatów została zweryfikowana pod kątem zanieczyszczeń białkowych oraz kwasami nukleinowymi.

Wyznaczenie jednostek aktywności otrzymanych polimeraz. Dla każdego z otrzymanych preparatów doktorantka przeprowadziła fluorymetryczny test aktywności polimerazowej celem oznaczenia ilości jednostek aktywności w 1 μ l preparatu białkowego. Pomiary wymagały optymalizacji celem poprawnego wyznaczenia aktywności białek. Powodzeniem zakończyły się badania dla 12 białek na bazie polimerazy Bsu. Niestety konstrukty oparte o polimerazę Phi29 były nieaktywne enzymatycznie.

Określenie czy otrzymane konstrukty polimeraz wiążą się do kwasów nukleinowych. Za pomocą EMSA autorka pracy przeanalizowała powinowactwo otrzymanych pochodnych polimerazy Bsu co pozwoliło na wytypowanie zestawień modyfikacji poprawiających wiązanie do kwasów nukleinowych.

Zweryfikowanie wpływu partnerów fuzyjnych polimerazy Bsu na efektywność amplifikacji izotermicznej a także na stabilność i odporność na inhibitory polimeryzacji. W pierwszej kolejności doktorantka przeprowadziła optymalizację warunków reakcji enzymatycznej dla wszystkich konstruktów a następnie przeprowadziła szeroką analizę wpływu temperatury na przebieg reakcji amplifikacji DNA oraz na aktywność polimerazy. W kolejnej serii doświadczeń autorka rozprawy sprawdziła tolerancję polimeraz na obecność czterech różnych inhibitorów w mieszaninie reakcyjnej.

Rozdział Wnioski i dyskusja stanowi bardzo dobry komentarz Pani mgr. inż. Klaudii Marlickiej do wyników otrzymanych w trakcie realizacji pracy. Doktorantka wykazuje praktyczną użyteczność zastosowania białek fuzyjnych w gospodarce oraz badaniach naukowych i w tym kontekście wykazuje ważność zaplanowanych przez siebie badań oraz potencjalne zastosowania otrzymanych przez siebie fuzyjnych polimeraz. Autorka pracy krytycznie komentuje otrzymane przez siebie wyniki, odnosząc je do odpowiednich pozycji literaturowych. Dyskusja jest na odpowiednim poziomie szczegółowości, co odzwierciedla dobrą znajomość tematu oraz dojrzałość naukową doktorantki.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się kilka uwag oraz pytań:

W tabeli 3 (polimeraza Tzi) można znaleźć określenie: „Zwiększona produktywność, wydajność i procesywność” natomiast na stronie 38 w kontekście polimeraz fuzyjnych znajduje się określenie o poprawie ich procesywności i efektywności. Proszę o wyjaśnienie tych terminów.

Na stronie 57 znajdują się informacje o schematach kolorów, wśród nich – „Zielony – gen polimerazy Bsu” czy chodzi o gen czy wyłącznie sekwencję kodującą polimerazy? Podobnie tytuł rozdziału 5.1.2 wskazuje na klonowanie genów, chodzi o klonowanie genów czy sekwencji kodujących?

Na stronie 102 pojawia się informacja o białku W9, na stronie 113 o białku W2, w pracy nie wyjaśniono które to białka. Na stronie 22 pojawia się informacja, że Val250 jest enzymem.

We wzorze na stronie 72 jest molowy czy właściwy współczynnik ekstynkcji, dlaczego w mianowniku jest 2?

W metodach: 4.2.1, 2.6.2 i 4.8.2 nie podano ilości dodawanego bromku etydyny lub barwnika Midori Green Xtra.

Wśród znaczników ułatwiających rozpuszczalność, oczyszczanie lub immobilizację pojawiła się biotyna, chyba chodziło o avitaq lub steptaq (Strona 155).

Na stronie 99 pojawia się zdanie: "Wolny przepływ zwiększa czas kontaktu białka ze złożem, dzięki czemu oczyszczane białko może silniej z nim oddziaływać". Szybkość przepływu ma raczej wpływ na penetrację złoża i ilość związanych cząsteczek, a nie siłę wiązania.

Dlaczego „Kluczowe do poprawnego zajścia reakcji było dodanie octanu magnezu na sam koniec, tuż przed inkubacją.” (Strona 72)?

Czy było konieczne oczyszczanie białka GH na złożu ssDNA-celuloza (rys. 31)? Preparat wydaje się wystarczająco czysty (rys. 30).

Czy wyjątkowo niska aktywność BLN_{SSB}H (tab. 18) może wynikać ze stopnia degradacji lub rozwinięcia białka (białko to otrzymano w relatywnie niskim stężeniu), co przekłada się na wyniki kolejnych pomiarów.

Na rysunkach 34-36 na wykresach „Pionową linią przerywaną zaznaczono czas dla którego wyznaczano aktywność”. Jak dobierano ten czas, w niektórych przypadkach wydaje się bardzo krótki w stosunku do fragmentu krzywej, gdzie obserwuje się liniowy przebieg reakcji.

Dlaczego w przypadku testów wiązania ssDNA wybrano politymidynę, a czy dla innych oligonukleotydów można spodziewać się podobnych wyników?

W jaki sposób wyznaczono wartości liczbowe dla eksperymentów opóźnienia migracji w żelu (tab. 19)?

W załączniku powinna znaleźć się tabela z temperaturami przyłączania dla poszczególnych starterów.

Praca nie straciłaby na wartości, gdyby część figur znalazła się jako załącznik, a w rozdziale Wyniki zostały tylko reprezentatywne pomiary oraz podsumowujące je tabele.

We Wstępie oraz Celu pracy znalazły się pomyłki redakcyjne w zdaniach: „Większość genowe dla białek fuzyjnych....”, „Dzięki analizie właściwości uzyskanych polimeraz fuzyjnych....”

Czy multiplikowanie ilości domen oddziałujących z kwasami nukleinowymi w konstrukcjach fuzyjnych polimeraz mogłoby poprawić ich parametry?

Pochodne polimerazy Phi29 nie wykazywały aktywności biologicznej. Przyczyną mogą być zawady steryczne lub nieprawidłowe zwinięcie białka. Czy były próby modelowania struktury? Jakimi metodami można zbadać, czy białko jest natywne? Jakie alternatywne metody zwijania białka można użyć w celu otrzymania natywnego preparatu?

Podsumowując, badania przeprowadzone przez Panią mgr. inż. Klaudię Marlicką dostarczają wielu wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym. Doktorantka jest współautorem dwóch zgłoszeń patentowych, a opracowane w ramach realizacji pracy fuzyjne polimerazy mają potencjał komercyjny. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie Biotechnologia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych” jest wysoka, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r. poz. 1571). Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Klaudii Marlickiej przez Radę Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej do dalszych etapów przewodu

doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze olbrzymią ilość wykonanej pracy oraz poziom przedstawionej rozprawy wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą. Uzasadnienie przyznania wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Klaudii Marlickiej przedstawiam w odrębnym wniosku.

Daniel Krowarsch