



Prof. dr hab. n. med. Izabela Zawlik
Kierownik Zakładu Genetyki Ogólnej
Kierownik Laboratorium Biologii Molekularnej
Przyrodniczo–Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych
Wydział Medyczny
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 14.10.2025

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Klaudii Marlickiej pt. „Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Klaudii Marlickiej pt. „Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych” została przygotowana pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Olszewskiego, prof. PW oraz Pani dr Katarzyny Szymańskiej pełniącej rolę promotora pomocniczego.

Praca była częściowo realizowana w ramach projektu „Rozwój nowoczesnej diagnostyki zakażeń na bazie elektrochemicznych macierzy czujnikowych jako elementów detekcyjnych przenośnych, niskokosztowych urządzeń POC dedykowanych szybkim i wiarygodnym analizom genetycznym” finansowanego przez Agencję Badań Medycznych na podstawie umowy o objęcie Przedsięwzięcia wsparciem nr 2024/ABM/03/KPO/ KPOD.07.07-IW.07-0081/24-00 w ramach Krajowego Planu Odbudowy i Zwiększania Odporności, Komponent D Efektywność, dostępność i jakość systemu ochrony zdrowia, Inwestycja D3.1.1 Kompleksowy rozwój badań w zakresie nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Tematyka recenzowanej rozprawy doktorskiej dotyczy zaprojektowania oraz charakterystyki fuzyjnych wariantów polimeraz DNA o ulepszonych właściwościach do zastosowań w izotermicznej amplifikacji DNA. Niniejsza rozprawa doktorska stanowi rozszerzenie wiedzy na temat fuzji polimeraz DNA oraz ich zastosowania w izotermicznej amplifikacji DNA. Intensywny rozwój metod molekularnych spowodował wzrost zapotrzebowania na ulepszone polimerazy DNA. Metoda PCR, która polega na powieleniu fragmentu DNA z zastosowaniem polimerazy DNA stanowi podstawę

diagnostyki molekularnej wielu chorób, w tym zakaźnych i nowotworowych. Coraz powszechniejsze zastosowanie technik molekularnych zarówno w medycynie jak i w innych dziedzinach sprawia, że istnieje konieczność opracowania nowych ulepszonych polimeraz, które umożliwią powielenie materiału genetycznego w warunkach izotermicznych.

W związku z powyższym temat podjęty przez Doktorantkę uważam za wybitnie interesujący i istotny dla uzyskania wysokowydajnych polimeraz DNA do zastosowania powielanie materiału genetycznego bez użycia termocyklera. Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej mają charakter praktyczny i mogą przyczynić się do postępu w diagnostyce molekularnej.

Praca doktorska została wydana w formie oprawionego maszynopisu liczącego 199 stron. Praca ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, wnioski i dyskusja, podsumowanie, wykaz skrótów, spis rysunków, spis tabel, załączniki (m.in. sekwencje aminokwasowe polimerazy Bsu i polimerazy Phi29) oraz bibliografia. Praca doktorska zawiera 69 rysunków oraz 23 tabele, w większości obrazujących uzyskane wyniki, co pozwala na dokładne prześledzenie i analizę wszystkich wyników. Bibliografia pracy obejmuje 165 pozycji literaturowych głównie anglojęzycznych pochodzących z ostatnich kilku lat. Praca została starannie przygotowana pod względem graficznym, bardzo dobrze zredagowana oraz poprawnie napisana pod względem językowym. W tym miejscu należy jednak wskazać, że w Streszczeniu w języku polskim na stronie 7 następujące zdanie cyt.: „Większość genów dla białek fuzyjnych otrzymano z wykorzystaniem klonowania metodą Gibsona” nie jest jasne. Ponadto, nie podano tłumaczenia w języku polskim skrótu pożywki „SOC” oraz nie podano w ogóle co oznacza skrót „TAE”, ani w wykazie skrótów, ani w tekście. Jednakże, takie drobne błędy czy nieścisłości nie zmniejszają wysokiego poziomu merytorycznego przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

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 4 podrozdziały, w których przedstawiono charakterystykę polimeraz, opis metod

służących do amplifikacji DNA, opis białek wiążących kwasy nukleinowe oraz charakterystykę fuzyjnych polimeraz DNA.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie, otrzymanie i przebadanie nowych fuzyjnych polimeraz do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych. Fuzje składały się z polimerazy Bsu z *Bacillus subtilis* lub polimerazy Phi29 z bakteriofaga Φ29 oraz białek wiążących kwasy nukleinowe – gp32, NeqSSB oraz Neq150. Cele pracy zostały precyzyjnie przedstawione i poprawność ich sformułowania nie budzi wątpliwości. Przystawiono również 5 celów szczegółowych tj. 1. Zaprojektowanie i otrzymanie konstruktów genowych kodujących białka fuzyjne oraz referencyjne; 2. Optymalizacja procesu otrzymywania i oczyszczania polimeraz DNA; 3. Wyznaczenie aktywności enzymów fuzyjnych; 4. Optymalizacja amplifikacji izotermicznej DNA; 5. Zbadanie właściwości otrzymanych polimeraz DNA. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane w kontekście spełnienia założonych celów pracy doktorskiej. W pracy wyszczególniono dokładnie zastosowaną aparaturę i materiały zużywalne oraz zastosowane odczynniki chemiczne, enzymy i białka, plazmidy, markery wielkości, szczepy bakteryjne i drożdżowe, komercyjne zestawy odczynników, podano skład roztworów i buforów oraz pożywek, a także zestawienie starterów używanych w metodzie klonowania Gibsona, zestawienie starterów używanych do wyznaczania właściwości polimeraz i wykorzystywane bazy danych i narzędzia bioinformatyczne.

Dobór metod badawczych został przeprowadzony w prawidłowy sposób. Wszystkie etapy badawcze zostały prawidłowo zaprojektowane i zrealizowane. Cele badawcze pracy realizowano przy użyciu dwóch reakcji i odpowiednich enzymów tj.: reakcji RPA (ang. *Recombinase Polymerase Amplification*) z polimerazą Bsu z *Bacillus subtilis* oraz reakcji amplifikacji toczącego się koła (ang. *Rolling Circle Amplification*, RCA) z polimerazą Phi29 z faga Φ29. Do stworzenia fuzyjnych polimeraz zastosowano trzy białka wiążące DNA: gp32 z faga T4 oraz pochodzące z *Nanoarchaeum equitans* NeqSBB i Neq150. Większość genetycznych konstruktów dla białek fuzyjnych uzyskano metodą klonowania Gibsona. Białka nadprodukowano w bakteryjnym systemie ekspresyjnym z użyciem *E. coli* i oczyszczono za pomocą chromatografii jonowymiennej, chromatografii metalopowinowactwa, chromatografii grawitacyjnej na złożu ssDNA-celuloza. Następnie określono poziom zanieczyszczenia preparatów białkowych kwasami nukleinowymi. W kolejnych etapach oceniono właściwości

uzyskanych polimeraz DNA, wyznaczano jednostki aktywności polimeraz DNA, wyznaczono zdolność wiązania różnych form kwasów nukleinowych przez polimerazy DNA, dokonano optymalizacji warunków prowadzenia izotermicznej amplifikacji DNA opartej o białko gp32, zbadano wpływ temperatury na właściwości polimeraz DNA oraz zbadano tolerancję polimeraz DNA na obecność inhibitorów amplifikacji w mieszaninie reakcyjnej. Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki zostały zaprezentowane w uporządkowany sposób.

Jedynе zastrzeżenie w tym miejscu budzi fakt, że w rozdziale „Metody” w podrozdziałach: 4.6.2., 4.7.2, 4.8.1, 4.8.2 nie podano numerów zdjęć wyników elektroforetycznych; co ułatwiłoby śledzenie i analizę uzyskanych wyników.

Analiza otrzymanych wyników wykazała, że: 1) przyjęty sposób otrzymywania białek Phi29 jest nieskuteczny i należy go zmodyfikować; 2) dołączenie partnera fuzyjnego do polimerazy Bsu umożliwia przeprowadzenie reakcji amplifikacji izotermicznej DNA opartej o białko gp32, której nie przeprowadza enzym niezmodyfikowany; 3) białko NeqSSB jako partner fuzyjny nie wpływa lub wpływa negatywnie na właściwości i aktywność polimerazy Bsu; 4) białko gp32 jako partner fuzyjny zwiększa tolerancję polimerazy Bsu na obecność inhibitorów; 5) białko Neq150 jako partner fuzyjny zwiększa efektywność polimerazy Bsu i Bsu large; 6) białko Neq150 jako partner fuzyjny zwiększa stabilność w 55°C polimerazy Bsu large; 7) fuzja polimerazy Bsu z białkiem Neq150 spowodowała utratę aktywności podczas przechowywania.

Dyskusja 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. W Dyskusji wskazano na możliwość praktycznego zastosowania otrzymanych polimeraz w reakcji RPA. Doktorantka odnosi się do możliwości praktycznego zastosowania otrzymanych polimeraz głównie w diagnostyce chorób zakaźnych i badaniach archeologicznych.

W tym miejscu nasuwa mi się pytanie do Doktorantki o wskazanie zastosowania otrzymanych polimeraz w diagnostyce molekularnej chorób nowotworowych, gdzie do

analiz używa się trudne matryce tj. tkanki nowotworowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie.

Uzyskane w pracy wyniki są niezwykle istotne z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego; stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę naukową dotyczącą opracowania enzymów do szybkiej diagnostyki genetycznej.

Wnioski końcowe

Prezentowana praca doktorska wskazuje na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki oraz opanowanie przez nią warsztatu badawczego. Wysoko oceniam wartość naukową przedstawionej pracy doktorskiej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i prezentuje ogromną wiedzę teoretyczną Doktorantki we wskazanej dyscyplinie naukowej oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa doktorska pt. „Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych” 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 inż. Klaudii Marlickiej do dalszych etapów postępowania 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