

dr hab. Szymon Ziętkiewicz

2.IX.2025r. Gdańsk

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. KLAUDII MARLICKIEJ
PT. „FUZYJNE POLIMERAZY DO AMPLIFIKACJI IZOTERMICZNEJ
KWASÓW NUKLEINOWYCH”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska wykonana została przez mgr. inż. Klaudię Marlicką pod kierunkiem dr hab. Marcina Olszewskiego, prof. PW, promotora pracy, oraz dr Katarzyny Szymańskiej, promotora pomocniczego, w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków Politechniki Warszawskiej. Praca mgr. inż. K. Marlickiej dotyczy badań nad otrzymaniem nowych fuzyjnych polimeraz DNA których właściwości usprawniałyby ich zastosowanie w procesach izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych. Zastosowanie inżynierii białkowej dla uzyskania nowych, ulepszonych białek fuzyjnych mających potencjalne zastosowanie w tej technice badawczej jest wyzwaniem bardzo aktualnym, obiecującym i prezentującym potencjał zarówno poznawczy jak i aplikacyjny.

Jest to zakres tematyczny bardzo dobrze mieszczący się w ramach dyscypliny naukowej „Biotechnologia”, w której to została złożona.

Formalne i edytorskie aspekty złożonej pracy oceniam pozytywnie. Rozprawa wykonana jest w formie liczącej 199 stron rozprawy, mającej typowy (a zarazem właściwy) układ części, scharakteryzowany poniżej. Podkreślić należy staranne opracowanie i czytelne w reprodukcji wykonanie rycin, zwłaszcza dokumentujących rozdziały elektroforetyczne. W zakresie edytorskim i redakcyjnym nieliczne uchybienia (jak czarne tło struktury na rys. 9a, malutkie, a przez to mniej czytelne w druku, opisy osi rozdziałów chromatograficznych, nieco mniej

czytelne napisy na zaznaczonych intensywnym kolorem obszarach - rys. 9b, tab.4, rys. 14, kolorystyka krzywych na chromatogramach) według mnie nie umniejszały bynajmniej ogólnie wysokiej oceny staranności przedstawienia rozprawy. Również strona językowa pracy nie budzi zastrzeżeń - napisana jest ona prawidłowym językiem fachowym z bardzo nielicznymi omyłkami pisarskimi (np. "większość genowe" w „Streszczeniu”, „sefarozowaego” str. 160), a tok narracji jest logiczny i spójny. Praca opatrzona jest wykazami skrótów, rycin i tabel oraz sekwencji aminokwasowych stanowiących elementy opracowywanych białek fuzyjnych (w której zapewne pomocą dla czytelnika wersji "papierowej" byłoby jednak podanie identyfikatorów UniProt).

Zgodnie z klasycznym układem rozpraw, przedłożona praca rozpoczyna się (po stosownych streszczeniach w jęz. polskim i angielskim) „Wstępem” wprowadzającym w tematykę polimeraz DNA ze szczególnym uwzględnieniem użytych w pracy polimeraz Bsu oraz Phi29 oraz samego procesu amplifikacji izotermicznej w jego różnych odmianach i mechanizmach. Obejmuje on także krótką lecz spójną charakterystykę użytych jako partnerów fuzyjnych białek wiążących kwasy nukleinowe. „Wstęp” cytuje 150 pozycji literaturowych. Ich dobór i opracowanie świadczy o dobrym zaznajomieniu się z literaturą przedmiotu i przygotowaniu teoretycznym Doktorantki.

Rozdział 2 pracy zawiera syntetyczne przedstawienie celu pracy. Doktorantka przedstawia go, zgodnie z tytułem rozprawy, jako otrzymanie i przebadanie nowych polimeraz do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych; następnie zaś przedstawia cele szczegółowe postępowania badawczego. Merytoryczna ocena postawionego sobie przez Autorkę celu nie pozostawia wątpliwości, że jest on istotny poznawczo z punktu widzenia prac nad mechanizmami molekularnymi zachodzącymi w procesach izotermicznej amplifikacji DNA a jego rozwiązanie potencjalnie otwiera możliwości interesujących rozwiązań również o charakterze praktycznym, jako że „usprawnione” w ten sposób polimerazy mogą znaleźć szerokie zastosowania. Z czysto formalnego punktu widzenia należy jednak zauważyć, że badania doktorantki dotyczyły jedynie amplifikacji DNA, zaś pojęcie „kwasy nukleinowe” obejmuje także RNA, nie mieszczące się przecież w tematyce badań. Nie jest to jednak oczywiście zarzut do tematyki pracy. Uważam także, że wygodniej dla czytelnika byłoby ująć w tym właśnie miejscu hasłowe uzasadnienie wyboru

fuzji genowych. Autorce przecież z pewnością nie chodziło jedynie o to, aby polimerazy te były „nowe”, lecz by cechowały się bardziej korzystnymi z punktu widzenia praktycznego cechami, jak stabilność, aktywność itp. Oczywiście, wybrzmiewa to całkowicie jasno w lekturze rozprawy jako całości i jest to przez Autorkę zrealizowane, uwaga moja dotyczy jedynie korzystniejszego sformułowania tej części pracy. Cele szczegółowe natomiast przedstawione są dostatecznie precyzyjnie, zaś z kolejnych części rozprawy płynąć będzie wniosek o ich pomyślną realizację.

Rozdziały poświęcone materiałom (rozdz. 3) i metodom (rozdz. 4) użytym w pracy napisane są dokładnie i szczegółowo, nie budząc moich zastrzeżeń co do możliwości reprodukcji wyników. Gwoli ścisłości chciałbym jedynie zauważyć brak oznaczenia, w przypadku składów buforów, że stężenia wyrażone w procentach dotyczą procentu waga/objętość, nie zaś masowego (o ile jest tak w rzeczywistości, czego się domyślam). Niefortunnym wydaje mi się także zapis „5% mieszaniny akrylamidów” w opisie żelu zagęszczającego (i analogiczny w opisie żelu rozdzielającego), gdyż sugeruje że dodano mieszaninę (nie znalazłem jej składu/pochodzenia) w ilości 5% końcowej objętości, nie zaś (co zapewne ma miejsce), że łączne finalne stężenie akrylamidu/bisakrylamidu (proporcje?) w żelu wynosi ten właśnie procent. Nie jest to jednak zarzut w żadnej mierze istotny, gdyż dotyczy bardzo rutynowej techniki o powszechnie znanych protokołach.

Stwierdzić także należy, że dobrane przez Doktorantkę metody badawcze są adekwatne do postawionego sobie problemu. Do otrzymania dla każdej z dwóch analizowanych polimeraz DNA czternastu zaprojektowanych konstruktów genetycznych niezbędnych do ekspresji białek fuzyjnych doktorantka posłużyła się standardowymi metodami biologii molekularnej, wychodząc od czterech genów syntetycznych z optymalizowanym do ekspresji w *E. coli* użyciem kodonów i wyprowadzając kolejne w drodze klonowania. Uzyskanie preparatów białkowych również odbywało się z zastosowaniem typowych, prawidłowo dobranych i wykonanych procedur mikrobiologicznych i biochemicznych. Czynności te były zapewne pracochłonne a wykonanie ich świadczy o opanowaniu warsztatu badawczego i laboratoryjnej biegłości. Niemniej, nie udało się uzyskać aktywnych preparatów wirusowej polimerazy Phi29 mimo iż ich oczyszczanie opisane jest w cytowanej literaturze i jest ono dostępne komercyjnie. Białko to przechodziło do frakcji

rozpuszczalnej jedynie w obecności detergentów i nie wykazywało aktywności. W tym kontekście nasuwa się pytanie, czemu w zastosowanych buforach nie zastosowano β -merkaptoetanolu. Polimeraza Phi29 zawiera bowiem aż 3 cysteiny zaś Bsu-ani jednej. Być może także Phi29 jest bardziej podatna na denaturację w warunkach lizy przez sonikację, co nie jest rzadkim zjawiskiem. Oba te czynniki doktorantka wskazuje w "Dyskusji", wydaje się jednak że ich doświadczalne sprawdzenie nie byłoby nadmiernie pracochłonne. Muszę jednak nadmienić, że w przypadku nieuzyskania aktywności samej polimerazy, dyskutowanie nieaktywności jej form fuzyjnych wydaje się mieć ograniczoną celowość. Co najwyżej skonstatować można, iż żaden z partnerów fuzyjnych nie poprawił niskiej stabilności wyjściowego enzymu. Autorka winna raczej przynajmniej zasugerować metodę określenia stanu konformacyjnego tej polimerazy. Można także wskazać, że polimeraza Phi29 oczyszczana była przez Takahashi i wsp (PLOS One 2014, 9(2):e82624 jako fuzja z GST w obecności trehalozy jako czynnika przeciwdziałającego agregacji), którzy to autorzy w pracy tej wspomnieli *explicite* o agregacji tego białka na kolumnach, nawet w 4 °C. Zapewne więc forma Phi29 rozpuszczalna w zawierającym detergenty buforze S2 nie jest niestety formą natywną.

Niemniej, tego rodzaju problemy zdarzające się w pracy biochemika bywają niekiedy trudne do przewidzenia i zaradzenia im w przewidywalnym czasie - decyzja Autorki o ograniczeniu się do analizy fuzji białka Bsu jest więc racjonalna a element znaczenia naukowego prezentowanych wyników i tak oceniam jako wysoki.

Pozostając przy problematyce stabilności preparatów białkowych, zauważyłem również, że metoda użyta przez Doktorantkę do długoterminowego przechowywania preparatów obejmuje dodanie krioprotektantu i przechowywanie w -20°C. Ponieważ nie podano czy Doktorantka przed umieszczeniem w zamrażarce zamrażała preparaty w ciekłym azocie, można się domyślać że proces zamarzania przebiegał powoli, co podnosi ryzyko „zimnej denaturacji” białek, zwłaszcza używając zamrażarek -20 a nie -80 °C.

Autorka tytułuje rozdział 4.6.2 jako „Czystość preparatów białkowych”, choć opisana procedura dotyczy jedynie badania zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi. Metodycznie badanie to jest oczywiście jak najbardziej zasadne i prawidłowe, winno być jednak nazwane precyzyjnie, gdyż pod pojęciem "czystości preparatu" ogólnie rozumie się w pierwszym rzędzie obecność lub

brak współocyszczających się białek (co oczywiście uwidocznione jest na licznych żelach SDS-PAGE z przebiegu oczyszczania i nie budzi samo w sobie żadnych zastrzeżeń).

Rozdział „Wyniki” zawiera obficie ilustrowane rycinami przebiegi oczyszczania preparatów białek fuzyjnych oraz aktywności uzyskanych preparatów - dane te są również zebrane tabelarycznie. Sposób prezentacji wyników nie budzi zastrzeżeń. Można by co najwyżej rozważyć zastosowanie analizy densytometrycznej bardzo licznych żeli używanych w technice EMSA oraz co być może pozwoliłoby na ułatwienie lektury rozprawy przez zebranie ich na mniejszej liczbie wykresów. Zestawienia tabelaryczne wyników wskazują spójnym kodem kolorów na odniesienie do referencyjnych wartości preparatu komercyjnego polimerazy, co ułatwia czytelnikowi ocenę osiągnięcia celu którym jest otrzymanie polimeraz o korzystniejszych wartościach. Takie wartości jak zachowanie aktywności w stężeniu heparyny 25x wyższym niż najwyższe dla białka referencyjnego, bądź obserwowanie przebiegu reakcji przy 125x mniejszej ilości polimerazy fuzyjnej niż samej jednostki dużej Bsu świadczą o osiągnięciu celu jakim jest otrzymanie usprawnionych wariantów. Interesujące wydają się także wyniki stabilności termicznej polimeraz, wskazujące na ochronny charakter elementów fuzyjnych, zwłaszcza Neq150 przedłużającego 6x czas po którym następuje inaktywacja preparatu w 55 °C. Nie było jednak dla mnie zupełnie jasne, ile wynosił czas prowadzenia amplifikacji DNA po okresie inkubacji w wysokiej temperaturze - ponieważ na żelu uwidoczniony jest jedynie efekt końcowy, trudno analizować zmiany szybkości reakcji o ile nie spadła ona w okolice zera. Dlatego też być może celowym byłoby rozważenie wzbogacenia tej analizy o jakąś formę oszacowania stabilności konformacyjnej białek w funkcji temperatury/czasu inkubacji ortogonalną do analizy ich aktywności biochemicznej.

„Dyskusja” uzyskanych w pracy wyników, obecna na 11 stronach rozprawy, jest spójna i logiczna, wskazując na wagę celu, zakres jego osiągnięcia i konfrontuje uzyskane wyniki z cytowanymi doniesieniami literaturowymi. Prócz uwagi poczynionej powyżej (dot. interpretacji braku aktywności form fuzyjnych) wskazałbym jeszcze, że proponowane przez Autorkę wyjaśnienie spadku aktywności białka fuzyjnego BLN₁₅₀H w trakcie przechowywania w drodze

badania techniką SDS-PAGE degradacji w czasie przechowywania wypadaloby uzupełnić o badanie stanu konformacyjnego, gdyż być może to on właśnie ulega zaburzeniu szybciej niż sama ciągłość łańcucha polipeptydowego.

Zakres literatury z której korzystała Autorka, obejmuje 165 pozycji, obejmujących prócz stanowiących zdecydowaną większość prac oryginalnych, również prace przeglądowe, doniesienia patentowe, bazy danych i strony internetowe. Aspekty formalne nie budzą większych zastrzeżeń, prócz nielicznych uchybień (np. tytuł złożony kapitalikami w poz. 8, 25, czy dopisek „Publisher [...]” w poz. 55, niespójne z resztą pozycji podanie PMID w poz. 81.

Pozycja literaturowa [161], z której cytowana jest jako rozdział książki „DNA Replication, rozdział [5]” przy czym rozdział ten znajduje się także w *Methods in Enzymology* 1995, 262:42-49; wydaje się że artykuł może być łatwiej dostępny niż książka dla czytelnika rozprawy.

Z przedłożonej mi do recenzji opisaney powyżej rozprawy wnioskuję, że Autorka podjęła się istotnego nie tylko poznawczo, ale i praktycznie celu naukowego. Racjonalne zaprojektowanie i precyzyjne przebadanie szeregu konstruktów białkowych zaowocowało otrzymaniem preparatów o istotnie ulepszonych parametrach funkcjonalnych, czego świadectwem są dwa zgłoszenia patentowe. Jednocześnie zawarte w pracy dane stanowią interesujący materiał dla kontynuacji prac nad tą tematyką, co zresztą wskazuje w pracy Autorka. Badania zostały zaprojektowane racjonalnie i wykonane z należyłą starannością zaś interpretacja wyników prowadzona jest z należnym krytycyzmem. Wskazane w niniejszej recenzji niedoskonałości nie mają bynajmniej charakteru nieprawidłowości mogących rzutować na wysoką merytoryczną ocenę rozprawy doktorskiej.

KONKLUZJA

Jak wynika z powyższych uwag recenzenckich, przedmiotowa rozprawa doktorska, mająca postać pracy pisemnej opatrzonej wymaganym streszczeniem w jęz. angielskim, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki (w wysokim stopniu) oraz świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (w zakresie przeprowadzania badań biochemicznych, przedstawienia, analizy i interpretacji wyników). Uważam ponadto, że uzyskanie aktywnych produktów zaprojektowanych przez Autorkę fuzji genowych i przedstawienie wyników ich analizy biochemicznej stanowi niewątpliwie oryginalne rozwiązanie postawionego sobie problemu naukowego.

Stwierdzam więc, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Klaudii Marlickiej pt. "Fuzyjne polimerazy do amplifikacji izotermicznej kwasów nukleinowych" spełnia warunki ujęte w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r poz. 1571 z późn. zm.) .

Wobec powyższego rekomenduję Wysockiej Radzie Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej dopuszczenie mgr inż. Klaudii Marlickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk.

Zakład Biochemii Białek

dr hab. Szymon Ziętkiewicz

