

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. PWr
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

Wrocław, 06.06.2014 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Roberta Michała Boratyńskiego zatytułowanej „Charakterystyka i właściwości fizyko-chemiczne nietypowych endonukleaz restrykcyjnych klasy IIS”

Praca doktorska Pana mgr Michała Boratyńskiego została wykonana w Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Piotra Skowrona oraz opieką promotora pomocniczego Pani dr Agnieszki Żylicz-Stachuli. W Katedrze tej od lat eksploruje się z powodzeniem tematykę izolacji i pełnej charakterystyki biochemicznej endonukleaz, co pozwoliło na wypracowanie bardzo dobrego warsztatu pracy.

Niniejsza dysertacja doktorska jest całościowo spójna, a jej przedmiotem jest opis procesów izolacji, aktywności oraz charakterystyki właściwości fizyko-chemicznych nietypowych nukleaz restrykcyjnych. Problematyka enzymów restrykcyjnych jest bardzo ważna z punktu widzenia biologii molekularnej, badań genetycznych oraz chemicznych. Jest to bardzo szeroka dziedzina wiedzy rozwiązująca takie zagadnienia jak interakcje białko-DNA, budowa centrum aktywnego, procesy rozpoznawania różnych sekwencji DNA, czy cięcia DNA w zdefiniowanych miejscach. Dodatkowo uzyskane w tej materii wyniki badań genetycznych i biologicznych mogą służyć do konstrukcji mimetycznych syntetycznych zaawansowanych systemów o właściwościach endonukleaz.

Przedstawiona praca składa się z dziewięciu rozdziałów opisanych na 171 stronach. Układ pracy można by było uznać za standardowy przynajmniej w naukach chemicznych, jednakże Autor pracy zdecydował się na przedstawienie celu pracy w pierwszym rozdziale, a streszczenia w drugim rozdziale. W opinii Recenzenta jest to bardzo dobre rozwiązanie, które znacznie ułatwia zapoznanie się z przedstawioną w dysertacji tematyką.

W rozdziale pierwszym, moją uwagę przykuł opis celu pracy, który chociaż jest dość dobrze i szczegółowo zdefiniowany to brakuje mi w nim przede wszystkim odpowiedzi na pytanie z jakiego praktycznego powodu badanie nowych systemów restrykcyjnych lub restrykcyjno-metylujących jest istotne? Rozumiem, że dla Autora pracy pytanie to może być na tyle trywialne, że odpowiedź na nie została ujęta w omawianej części pracy.

Pan mgr Robert Boratyński rozpoczął dysertację bardzo dobrze napisanym wstępem, wprowadzającym czytelnika w tematykę systemów restrykcyjno-modyfikujących (R-M) charakteryzując ich prawdopodobne funkcje i znaczenie, mechanizmy regulacji, podział oraz szczegółowy opis endonukleaz, a kończąc charakterystyką bakterii termofilnych.

Ten fragment pracy jest napisany dobrze wskazując na swobodne poruszanie się Doktoranta w opisywanym obszarze badawczym. Jednakże, wzbogacenie tej części pracy schematami lub rysunkami na pewno wpłynęło by na dopełnienie tego fragmentu.

Rozdział 4 i 5 (razem 40 stron) zawiera opis materiałów i metod wykorzystywanych w pracy. Po przeczytaniu tych rozdziałów byłem pod wrażeniem dokładności opisu poszczególnych zastosowanych protokołów eksperymentalnych. Tak staranny opis pozwala na odtworzenie wszystkich eksperymentów opisanych w pracy.

Uzyskane przez Autora rezultaty realizowanych badań, a także ich dyskusja została przedstawiona w rozdziale 6. Pierwszy podrozdział 6.1 zawiera charakterystykę bakterii termofilnych *Bacillus licheniformis*, w tym ich pochodzenie, opis hodowli, identyfikację oraz metody izolacji. Identyfikację gatunkową komórek bakteryjnych przeprowadzono używając peptydowego profilowania bakteryjnego za pomocą metody spektrometrii mas MALDI-TOF w komercyjnym laboratorium. Po przypisaniu bakterii do gatunku opisano system identyfikacji R-M jako BiII.

Następny podrozdział 6.2 zawiera opis eksperymentu, w którym wykryto, że lizat bakterii *B. licheniformis* posiada aktywność restrykcyjną wobec DNA faga λ (ryc. 6) oraz plazmidu pUC19 (ryc.7), co potwierdziło obecność REazy w badanym materiale. Ponadto, określono wstępne warunki procesu trawienia DNA. W dalszym etapie pracy Autor dysertacji opisuje optymalizację warunków hodowli szczepu termofilnego, wyznaczając optymalny czas wzrostu bakterii oraz temperaturę hodowli. Ten fragment pracy przeplatany jest ciekawą dyskusją wyników świadczących o przemyśleniach Doktoranta, który nie kopiuje automatycznie procedur, lecz stara się je rozważnie analizować. W kolejnych podrozdziałach pracy została opisana procedura izolacji oraz oczyszczania enzymu. Aktywność endonukleolityczną otrzymanych frakcji oraz aktywności enzymu BiII podczas oczyszczania określono wobec referencyjnego plazmidu L pUC19. Po oczyszczeniu na złożu fosfocelulozowym dokonano rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE białek stosując jako markery wielkości białek: fosforylazę B (97 kDa), albuminę (66 kDa) owoalbuminę (45 kDa) i lizozym (14 kDa – tego białka nie widać na elektroforegramach ryc. 19-21), ustalając za pomocą krzywej wzorcowej masę białka BiII na 59-59.5 kDa (ryc. 22). Podsumowując procedurę oczyszczania Autor zebrał dane w tabeli 5 wykazując, że po każdym z etapów stopień oczyszczenia enzymu wzrastał wraz z jego aktywnością specyficzną.

Kolejny podrozdział 6.3 zawiera opis metody wyznaczania masy cząsteczkowej białka BiII za pomocą sączenia molekularnego. Stosując odpowiednie krzywe kalibracji Doktorant wyznaczył promień Stokesa na 34 Å, a masę cząsteczkową na 60 +/- 9 kDa potwierdzając w ten sposób wcześniej otrzymaną masę enzymu.

W następnym podrozdziale 6.4 mgr Boratyński opisuje właściwości fizyko-chemiczne otrzymanego białka, wyznaczając optymalne parametry pracy enzymu: temperaturę, pH oraz zależność aktywności białka od stężenia octanu magnezu i chlorku sodu, stosując jako substrat reakcji plazmid L pUC19. W następnym kroku posiadając zoptymalizowane parametry działania endonukleazy przeprowadza eksperymenty mające na celu charakterystykę specyficzności substratowej tzn. ustalenie sekwencji rozpoznawanej i ciętej przez enzym BiII. Do tego celu używa DNA bakteriofaga T7, λ , plazmidów pUC19, pBR222 oraz pACYC184. Uzyskane wyniki zostały porównane z danymi dla enzymów referencyjnych (brak informacji jakimi?) i potwierdziły, że specyficzność badanej nukleazy jest identyczna do endonukleazy

restrykcyjnej BsaI. W celu wyjaśnienia, czy wyizolowany enzym jest izoschizomerem czy neoschizomerem wykorzystana została strategia sekwencjonowania polegająca na przecięciu matrycy sekwencyjnej za pomocą endonukleazy, następnie wyizolowaniu fragmentów oligonukleotydowych i ich sekwencjonowaniu wariantem fluorescencyjnym metody Sangera. W wyniku tego eksperymentu Doktorant dowiódł, że enzym BIII jest izoschizomerem endonukleazy BsaI, posiadającym inne parametry fizyko-chemiczne, oprócz wysokiej aktywności w buforze o niskim poziomie stężenia soli.

W powyżej opisanym fragmencie zostały skrupulatnie opisane wykorzystywane metody począwszy od wyboru i hodowli odpowiednich bakterii do izolacji i zaawansowanej charakterystyki biochemicznej enzymu posiadającego aktywność endonukleazy restrykcyjnej. Jednakże, w tych badaniach zabrakło względnie nieskomplikowanej metody wyznaczania masy cząsteczkowej jaką jest spektroskopia mas za pomocą której nie tylko można określić dokładną masę cząsteczkową białka, lecz również pokusić się o jego identyfikację w mieszaninach innych makromolekuł.

W drugiej części pracy (podrozdziały 6.5-6.8) mgr Boratyński podjął się analizy genetyczno-biochemicznej enzymu TspDTI pochodzącego z bakterii *Thermus* sp. DT.

Rozumiem, że jest to kontynuacja badań, które Doktorant cytuje w pracy jako referencje: Skowron i wsp., 2003 oraz Żylicz-Stachula i wsp., 2012, a przedmiot badań - enzym TspDTI był wyizolowany wcześniej, jak powyżej wspomniałem przy udziale Promotora Autora pracy (Skowron i wsp., 2003). Enzym ten jest bifunkcyjny i posiada właściwości restrykcyjno-metylujące i jest nietypowo dużym białkiem spotykanym u prokariota - MW=126,8 kDa. Enzym ten trawi DNA niecałkowicie z tego względu w pierwszym etapie badań, Autor pracy starał się znaleźć substraty za pomocą których najlepiej można by było opisać aktywność tego białka. Następnie wykonano ukierunkowaną mutagenezę badanego enzymu, po pierwsze w celu zbadania wpływu określonych motywów aminokwasowych na sposób oddziaływania z DNA, po drugie w celu zbadania wpływu zmian na aktywność metylującą i restrykcyjną białka poprzez zmianę sekwencji aminokwasowej NPPW na APPW w centrum katalitycznym. Jako białko referencyjne stosowano niemodyfikowany system TspDTI. Wykonano trzy warianty zmutowanych enzymów: a) opisany jako II wariant TspDTIDTRD2CC jest to system z delecją fragmentu TRD2 oraz sąsiadującego regionu opisanym na rycinie 41 jako z j. ang. *coiled coil*; b) opisany jako III wariant TspDTIDTRD2 tylko delecją TRD2; c) opisany jako IV wariant TspDTI-APPW system ze zmianą w metylującym centrum katalitycznym NPPW na APPW. Doktorant postawił sobie jasne cele tych badań: 1) „czy i w jaki sposób utrata regionów TRD2 oraz *coiled coil* wpłynie na restrykcje DNA”; 2) jak zmiana punktowa aminokwasu wpłynie na właściwości restrykcyjne i metylujące zmodyfikowanego białka biorąc pod uwagę możliwość komunikacji interdomenowej w białku.

W następnym rozdziale 6.7 opisano szczegółowo ekspresję enzymu TspDTI wraz z zaplanowanymi mutacjami w komórkach *E. coli* BL21(DE3) wykorzystując plazmid pRZ4737mod-tspDTIRM wraz ze zmutowanymi wariantami genu tspDTIRM. W tym rozdziale mgr Robert Boratyński omawia wpływ różnych czynników w tym czasu, temperatury rodzaju pożywki na prowadzoną hodowlę *E. coli* oraz wpływ toksyczności systemu restrykcyjno-metylującego dla rekombinowanego gospodarza. Następnie Autor pracy omawia głównie oczyszczanie białka TspDTI, gdzie aktywność po każdym etapie była sprawdzana względem odpowiednich substratów DNA. W trakcie wykonywania eksperymentów Autor w znacznym

stopniu uprościł preparatykę izolowania białka w porównaniu z wcześniej opisaną w pracy (Skowron i wsp., 2003). W następnych dwóch podrozdziałach mgr Boratyński opisuje ekspresję i oczyszczanie wariantu enzymu: TspDTIDTRD2CC i TspDTIDTRD2, które po usunięciu motywu *coiled coil* i TRD2 oraz samego fragmentu TRD2 straciły aktywność restrykcyjną. Następnie Doktorant opisał ekspresję i oczyszczanie białka TspDTI-APPW, gdzie po opisie odpowiednich procedur pod koniec podrozdziału w ostatnim akapicie powraca do opisu i konkluzji dotyczących dwóch pozostałych wariantów. Moim zdaniem ten rozdział powinien być zakończony podrozdziałem konkludującym otrzymane wyniki, a wstawienie tego fragmentu w tym miejscu utrudnia znacznie czytanie niniejszej pracy doktorskiej, w której i tak znajduje się dość dużo skrótów myślowych. Dodatkowo wyjaśnienia wymaga co Doktorant miał na myśli pisząc ten fragment pracy. Niestety w omawianym podrozdziale nie zostały omówione przeprowadzone eksperymenty tak jak w poprzednich przypadkach i właściwie ten podrozdział wydaje się niezakończony.

Następny rozdział zawiera analizę porównawczą enzymu TspDTI względem wariantu posiadającego zmienione centrum katalityczne TspDTI-APPW. Przeprowadzone eksperymenty badające właściwości restrykcyjne obu białek wykazały, że zmutowany enzym w rejonie metylującego centrum katalitycznego posiada właściwości restrykcyjne nieznacznie niższe w stosunku do białka TspDTI. Jest to sytuacja przeciwna w stosunku do innego enzymu TspGWI-APPY (Żylicz i wsp., 2014), gdzie poprzez mutację przeprowadzoną w centrum aktywnym została niemal całkowicie wyłączona aktywność restrykcyjna. Dodatkowo enzym z mutacją punktową posiada również wyłączoną aktywność metylującą. Porównawcze badania właściwości fizykochemicznych enzymu TspDTI i wariantu zmienionego wykazały, że optymalna aktywność obu białek występuje w tym samym zakresie pH oraz temperatury. Ostatni rozdział stanowi podsumowanie osiągnięć Doktoranta.

Podsumowując, mgr. Robert Boratyński zrealizował z powodzeniem wszystkie wyznaczone sobie cele pracy wykazując przy tym duże umiejętności w aspekcie izolowania oraz badania systemów R-M. Pomimo tego, że przeprowadzone eksperymenty posiadały ustalony algorytm postępowania były również kreatywnie modyfikowane przez Doktoranta. Praca choć zawiera, jak już napisałem skróty myślowe, jest napisana zrozumiale, a ilustracje w części doświadczalnej w należyty sposób potwierdzają i dokumentują otrzymane wyniki. Autor dysertacji zadbał również w należyty sposób aby skróty literaturowe którymi się posługiwał w tekście były zebrane w jednym miejscu, co znacznie ułatwia czytanie pracy. W przedstawionej dysertacji Autor nie zawsze stosował się do zasad interpunkcyjnych oraz używał kolokwializmów. Jednak ani te, ani inne nie wymienione w recenzji niedopatrzienia nie wpływają na wysoką wartość osiągnięć Doktoranta prezentowanych w dysertacji oraz Jego umiejętności w prowadzeniu badań biochemicznych, a świadczą jedynie o tym, że praca prawdopodobnie była pisana w krótkim czasie.

Mgr. Robert Boratyński jest współautorem trzech publikacji, których tematyka znajduje się poza obszarem badań objętych w tej pracy oraz ośmiu doniesień zjazdowych. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy będą opublikowane jak pisze Autor w późniejszym czasie.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Roberta Michała Boratyńskiego spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z 18 kwietnia 2003 z późniejszymi zmianami i uzupełnieniami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a cursive script. The signature is positioned on the right side of the page, below the main text block.