

UNIwersytet Gdański



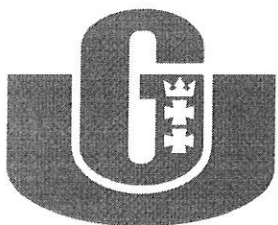
Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Katedra Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Tel. (58) 523 6024 (Sekretariat)
Fax: (58) 523 6025 (Sekretariat)
Fax: (58) 523 5501 (Kierownik Katedry)
e-mail: joanna.bart@biol.ug.edu.pl (Sekretariat)
e-mail: grzegorz.wegrzyn@biol.ug.edu.pl (Kierownik Katedry)
www.biology.ug.edu.pl/kbm

Gdańsk, 12 października 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani magister Klaudii Arciszewskiej
pt. „Identyfikacja i charakterystyka aptameru DNA wiążącego metkę lizylową – zastosowanie w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych”

Rozprawa doktorska Pani magister Klaudii Arciszewskiej zatytułowana „Identyfikacja i charakterystyka aptameru DNA wiążącego metkę lizylową – zastosowanie w chromatografii powinowactwa białek rekombinowanych” została przedstawiona w formie manuskryptu książki. Taka postać dysertacji jest jedną z możliwych form rozprawy doktorskiej, wymienionych w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), według której toczy się przewód doktorski Pani mgr Klaudii Arciszewskiej. Rozprawa ta ma układ typowy dla prac naukowych z zakresu nauk biologicznych. Podzielona została na kilka głównych rozdziałów: „Streszczenie” (w języku polskim i angielskim), „Wstęp”, „Cele pracy”, „Materiały i metody” (tu wskazać należy niefortunny tytuł tego rozdziału, w którym przedstawiono spis materiałów, nie zaś opisy metod – zawarte w następnym rozdziale), „Metody”, „Wyniki”, „Dyskusja” i „Spis literatury”. Rozprawa ta zawiera także 4 załączniki w postaci sekwencji starterów, charakterystyki białek wykorzystanych w tej pracy, sekwencji nukleotydowych kodujących je genów i sekwencji aptamerów DNA. Promotorem ocenianej rozprawy doktorskiej jest Pan dr hab. Wojciech Strzałka. Dysponuje on doświadczeniem i znaczącym dorobkiem naukowym w zakresie tematyki ocenianej rozprawy doktorskiej, zatem zapewniona została bardzo dobra opieka naukowa w ramach wykonywanej pracy. Jednostka naukowa stworzyła ponadto znakomite warunki do przeprowadzenia zaplanowanych w pracy badań.



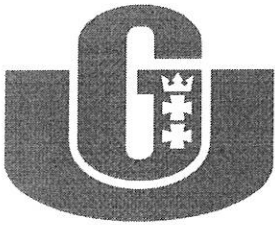
Celem pracy Pani mgr Klaudii Arciszewskiej było opracowanie aptamerów DNA zdolnych wiązać specyficznie znacznik lizylowy (kilka powtórzonych reszt lizyny na końcu łańcucha rekombinowanego białka), w celu ich wykorzystania w chromatografii powinowactwa. Mimo stosowania tego znacznika w biotechnologii od wielu lat, między innymi do przytwierdzania białek do różnych nośników, zadziwiającym wydaje się fakt, że do tej pory nie opracowano wiążącego go ligandu, który mógłby być zastosowany w chromatografii powinowactwa. Stąd postawiony przez Doktorantkę cel pracy uważam za ambitny i ważny naukowo.

W toku pracy, Pani mgr Klaudia Arciszewska wyselekcjonowała (zaczynając od metody SELEX) aptamery DNA wiążące znaczniki lizynowe, a następnie dokonała ich charakterystyki oraz wyboru najbardziej optymalnej wersji. Prace te wymagały zastosowania wielu nowoczesnych metod eksperymentalnych, od klonowania molekularnego, poprzez nadprodukcję i oczyszczanie rekombinowanych białek, przygotowanie biblioteki ssDNA, selekcję i analizę aptamerów, charakterystykę biofizyczną oddziaływań aptamerów z białkami, analizę biochemiczną tych oddziaływań, po optymalizację warunków chromatografii powinowactwa do oczyszczania białek zawierających znacznik lizylowy.

Należy podkreślić, że cel pracy został bez wątpienia osiągnięty. Doktorantka wykazała, że potrafi zaplanować badania, wykonać eksperymenty i zanalizować ich wyniki. Zatem bardzo pozytywnie oceniam merytoryczne osiągnięcia opisane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Klaudii Arciszewskiej. Jak w przypadku niemal każdej pracy naukowej, mam natomiast pewne uwagi i pytania, zarówno merytoryczne jak i natury redakcyjnej, które przedstawiam poniżej.

Uwagi merytoryczne:

- 1) Na Rysunku 3 (str. 31) przedstawiona jest liczba publikacji z lat 1991-2019 dotycząca wykorzystania aptamerów. Jednak w przypadku roku 2019 dane są oczywiście niepełne, gdyż trwał on w momencie składania rozprawy. Niemniej jednak, dla jednoznaczności prezentowanych danych należało podać, do jakiego miesiąca brane były pod uwagę publikacje z tego roku. Ponadto nie podano z jakiej bazy danych korzystano przy przygotowywaniu tej ryciny.



- 2) Na str. 81, Autorka pisze: „Z kolei wiązanie analizowanych aptamerów DNA do białka GFP pozbawionego metki lizylowej było zaniedbywalne”. Niemniej jednak, rycina obrazująca te wyniki (Rys. 14) wskazuje na obecność prążków będących sygnałami odzwierciedlającymi wiązanie białka GFP przez aptamery M13 i B7. Sygnały te są co prawda znacznie słabsze niż w przypadku analogicznych doświadczeń z białkiem GFP-7K, niemniej jednak wyraźnie widoczne. Mam zatem wątpliwość, czy można je nazwać „zaniedbywalnymi”? Czy Doktorantka mogłaby oznaczyć ilościowo sygnały pochodzące od białek GFP i GFP-7K (choćbyby densytometrycznie, dysponując oryginalnymi wynikami), porównać je, a podczas publicznej obrony pracy doktorskiej odnieść się do tego problemu?
- 3) Na Rys. 15 przedstawiona jest analiza wiązania przez testowane aptamery białek ze znacznikami zawierającymi różne liczby reszt lizyny. Proszę Doktorantkę o przedyskutowanie potencjalnego problemu przy oczyszczaniu białek, związanego z tym, że w genomie *Escherichia coli* kodowanych jest 5 białek zawierających ciąg czterech reszt lizyny, oraz 108 białek zawierających ciąg trzech reszt lizyny. Czy te białka nie będą miały tendencji do wiązania się do kolumny zawierającej przytwierdzone aptamery specyficzne do znacznika lizylowego? Obawa ta może być tym bardziej zasadna, że wyniki doświadczeń przedstawionych na Rys. 33 wskazują, że z kolumną zawierającą aptamer B5K, po naniesieniu ekstraktu białkowego z komórek *E. coli*, wiąże się co prawda głównie białko rekombinowane ze znacznikiem 5K, ale ewidentne jest także wiązanie się pewnych innych białek. Sama Doktorantka pisze, że czystość preparatu była na poziomie 80%, co wskazuje na stosunkowo liczne zanieczyszczenia innymi białkami.
- 4) Na str. 107 Pani mgr Klaudia Arciszewska argumentuje wybór białek rekombinowanych stosowanych w testowaniu specyficzności aptamerów tym, że „są one badane w Zakładzie Biotechnologii Roślin”. Uważam, że jest to nietrafna argumentacja. Wybierając obiekty badań powinno się brać pod uwagę ich specyficzne cechy, a nie to, że są badane w danej jednostce. Czy Doktorantka mogłaby podać jakieś racjonalne argumenty, wskazujące cechy białek GST, PCNA, PorB i Rad1, które przemawiają za wyborem właśnie ich w badaniach nad efektywnością oczyszczania rekombinowanych białek ze znacznikiem lizylowym przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa z testowanymi aptamerami?
- 5) Dyskusja zawiera stosunkowo dużo powtórzeń opisów wyników. Można było rozważyć połączenie rozdziałów „Wyniki” i „Dyskusja”.



- 6) Rys. 37 przedstawia prototypowy układ opracowanego złoża z aptamerem B5K. Uważam, że ta rycina jest zbędna. Przedstawia ona standardową pompę gradientową firmy Bio-Rad, standardową kolumnę i standardowe naczynie odbierające. Nie ma tu zatem żadnej nowości – nowością jest oczywiście aptamer związany do kolumny, ale tego na rycinie nie widać.

Uwagi redakcyjne:

- 1) Dlaczego str. 2 rozprawy doktorskiej jest pusta?
- 2) Str. 12 – określenie „fuzjowane” to raczej żargon laboratoryjny. Tak samo jak „Niewiele niższe wiązanie” (str. 86) – wiązanie może być słabsze, mniej efektywne, ale nie „niższe”.
- 3) Niektóre pozycje literaturowe są cytowane w nietypowy sposób w tekście, na przykład: „(Kozik i in. 2001:175-72)” – str. 19, albo „(Hage 2005:2)” – str. 21. Co oznaczają liczby po dwukropku? Zazwyczaj w tekście podaje się przy cytowaniach jedynie nazwiska autorów i lata ukazania się publikacji.
- 4) W przypadku niektórych rycin, legendy znajdują się w całości albo częściowo na następnych stronach, po stronie z ryciną. Taki układ utrudnia analizę rycin.
- 5) W zestawieniu analizy ilościowej, na Rys. 30B, wskazane byłoby podanie względnych wartości po pomiarze densytometrycznym, co ułatwiłoby analizę wyników.
- 6) W niektórych pozycjach w spisie literatury dane bibliograficzne są niepełne (np. brak nr woluminu, stron albo nr artykułu), np. pozycje: 6, 14, 53, 57, 138.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr Klaudia Arciszewska wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych przez siebie badań. Udowodniła, że potrafi rozwiązać problem naukowy poprzez odpowiednie zaplanowanie badań, wykonanie doświadczeń oraz interpretację ich wyników. Uzyskała istotne naukowo wyniki, opracowując nową metodę oczyszczania rekombinowanych białek z zastosowaniem chromatografii powinowactwa i aptamerów DNA. Stwierdzam zatem, że spełnione zostały warunki określone w 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 (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Arciszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.