



dr. hab Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii

Tel. 071-3709949

e-mail: zawilak@iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 04. 01.2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Karłowicz pt.:
„Structural-functional analysis of Lon protease from *Escherichia coli* –
-identification of DNA interaction site”

Rozprawa doktorska mgr Anny Karłowicz, wykonana pod opieką Pana Profesora Igora Koniecznego, dotyczy charakterystyki proteazy Lon *E. coli*, a w szczególności zagadnienia zależności aktywności proteolitycznej Lon od oddziaływania z DNA. Wyniki przedstawione w rozprawie są częścią szeroko zakrojonych badań prowadzonych w pracowni prof. Koniecznego dotyczących m.in. mechanizmów inicjacji i kontroli replikacji DNA bakterii.

Proteaza Lon jest jedną z głównych proteaz bakteryjnych zaangażowanych w usuwanie białek, zarówno tych uszkodzonych jak i białek prawidłowo sfałdowanych, przy czym białka natywne są usuwane z komórki na drodze proteolizy skoordynowanej z innymi procesami komórkowymi. Tym samym proteaza Lon bierze udział w regulacji wielu procesów życiowych bakterii zarówno w odpowiedzi na stres jak i w warunkach normalnego wzrostu. Proteaza Lon należy do białek AAA+, jest enzymem multimetrycznym, którego aktywność zależy od obecności kofaktorów: ATP, Mg²⁺ oraz DNA. Oddziaływanie Lon z DNA zostało wykazane po raz pierwszy ponad 30 lat temu, ale wciąż mechanizm zależności oddziaływania Lon z DNA a aktywnością proteolityczną Lon nie jest do końca wyjaśniony. Wiadomo, że bakteryjne proteazy Lon oddziałują z dsDNA, zarówno liniowym jak i superskręconym, przy czym powierzchnia oddziaływania, swoistość sekwencyjna i topologiczna oddziaływania oraz wpływ DNA na aktywność Lon są wciąż przedmiotem badań i przypuszczalnie mogą być gatunkowo specyficzne. W tym świetle badania podjęte przez Doktorantkę wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych, oryginalnych prac naukowych.

Napisana w języku angielskim rozprawa Mgr Anny Karłowicz ma formę klasyczną. W rozdziale „Introduction” Doktorantka wyczerpująco wprowadza w tematykę związaną z proteazami bakteryjnymi, ich strukturą i funkcją, przy czym białko Lon, będące przedmiotem badań, jest scharakteryzowane najdokładniej. W rozdziale „Objective” Doktoranta zwięźle, bo w 1 zdaniu, określa cel swoich badań. Uważam, że rozbudowanie tego rozdziału o krótki opis poszczególnych etapów badań byłoby dobrym wprowadzeniem do dalszych rozdziałów wynikowych. Rozdziały „Materials” i „Methods” szczegółowo opisują wykorzystywany materiał badawczy i stosowane techniki. Rozdział „Wyniki” („Results”) a następnie

„Discussion” stanowią główną część pracy, omówioną poniżej. Całość dopełniają streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz spis cytowanej literatury przedmiotu (odpowiednio Streszczenie, „Summary”, „List of abbreviations” i „References”). Do kompletności rozprawy brakuje jednak rozdziału zawierającego najważniejsze wnioski oraz rozdziału załączników, który zawierałby mapy plazmidów, sekwencje, złożenia sekwencji homologów Lon, które mogłyby ułatwić analizę pracy, szczególnie w kontekście szczegółów sekwencji (np. metek, miejsc cięcia proteaz, sekwencji plazmidów modyfikowanych w laboratorium) jak i analizy porównawczej homologów Lon. W tym miejscu należy podkreślić, że rozprawa została przygotowana starannie i czytelnie oraz, pomimo ww. uwag, zawiera wszystkie elementy i treści niezbędne do jej rzetelnej oceny.

Celem pracy podjętej przez Doktorantkę była identyfikacja w proteazie Lon *E. coli* miejsc wiązania DNA oraz zbadanie wpływu oddziaływania Lon-DNA na aktywność proteolityczną Lon. Analiza strukturalno-funkcjonalna zmierzała nie tylko do określenia powierzchni oddziaływania Lon-DNA, ale także do zaproponowania mechanizmu aktywacji Lon przez DNA, przy czym głównymi substratami, które wykorzystano do badania aktywności Lon były białka TrfA i α -kazeina. W celu realizacji badań, posługując się wynikami modelowania strukturalnego przeprowadzonego we współpracy z grupą prof. Bujnickiego, Doktorantka przygotowała konstrukty i oczyściła zmutowane formy *E. coli* Lon pozbawione wybranych domen oraz zawierające mutacje punktowe zmieniające powierzchnię oddziaływania z DNA (w sumie 7 białek). Oczyściła też niektóre inne białka niezbędne do analiz (TrfA, ClpP, HU) oraz samodzielnie przeprowadziła większość analiz przedstawionych w pracy. Materiały i wyniki uzyskane przez innych członków zespołu są odpowiednio zaznaczone w pracy. Podkreślić należy, że Doktorantka opanowała i zastosowała wiele technik biologii molekularnej, biochemicznych, biofizycznych, mikroskopowych a także analizę strukturalną, które pozwoliły jej osiągnąć cel pracy. Przywołanie w recenzji wszystkich wyników osiągniętych przez Doktorantkę nie jest możliwe, gdyż są one bardzo obszerne i wielowymiarowe. Wymienię tylko najistotniejsze osiągnięcia:

- Na podstawie analizy oddziaływania zmutowanych form Lon z DNA Doktorantka wyznaczyła, że domeną oddziałującą z DNA jest domena ATPazowa *E. coli* Lon. Domena ta zawiera dodatkowo naładowane aminokwasy tworzące potencjalne powierzchnie oddziaływania z DNA.
- Doktorantka wykazała, że dodatkowo naładowane powierzchnie heksamery Lon tworzone przez aminokwasy α/β -domeny AAA+, szczególnie zespoły aminokwasów K371/K376/R379 oraz R306/K308/K310/K311, są zaangażowane w oddziaływanie z DNA oraz aktywację proteazy Lon przez DNA *in vitro* (dr Katarzyna Węgrzyn i Marta Gross uzyskały oba zmutowane białka i wstępnie zbadały oddziaływanie z DNA techniką SPR, pozostałe wyniki charakteryzujące zmutowane białka zostały uzyskane przez Doktorantkę). Doktorantka wykazała, że oddziaływanie Lon z DNA ma znaczenie dla lokalizacji białka jak i aktywności Lon *in vivo*.

- Doktorantka wykazała, że aktywacja proteazy Lon przez DNA dotyczy proteolizy wybranych białek replikacyjnych wiążących DNA, np. TrfA, λ O czy RepE, natomiast nie dotyczy proteolizy białek niewiążących DNA (np. IbpA, IbpB, α -kazeiny). Może to wskazywać na ogólny mechanizm aktywacji Lon przez DNA, swoiście skierowany w stosunku do białek oddziałujących z DNA.
- Doktorantka wykazała, że oddziaływanie Lon z DNA i TrfA stymuluje aktywność ATPazową Lon. Wskazuje to na możliwy mechanizm regulacji aktywności proteolitycznej i degradacji substratu na drodze stymulacji aktywności ATPazowej Lon przez DNA. Jednak nawet wysoka własna aktywność ATPazowa zmutowanego białka Lon R306/K308/K310/K311 nie jest w stanie skompensować braku oddziaływania Lon z DNA, co wskazuje na złożony mechanizm aktywacji Lon przez oddziaływanie z DNA i substratem.
- Doktorantka wykazała, że oddziaływanie Lon z DNA zachodzi najwydajniej w obecności kofaktorów Mg^{2+} i ATP, a kofaktory te wpływają na strukturę kompleksu Lon-DNA.
- Doktorantka wykazała, że w obecności kofaktorów (Mg^{2+} oraz Mg^{2+} i ATP) Lon oddziałuje z superskręconym i liniowym DNA, ale przy braku kofaktorów Lon oddziałuje tylko z liniowym DNA. Wyniki wskazują na zależność aktywacji Lon od topologii oddziałującego z Lon DNA, a to z kolei na dodatkowy poziom regulacji aktywności Lon.
- Doktorantka wykazała, że Lon oddziałując z DNA ma zdolność translokacji po nici DNA.
- Na podstawie wyników Doktorantka zaproponowała model aktywności Lon związanej z degradacją białek o niewłaściwej konformacji oraz białek oddziałujących z DNA.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, dobrze udokumentowane, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu. Po przeczytaniu rozprawy nasunęły mi się następujące spostrzeżenia i pytania dotyczące pracy.

- W badaniach proteolitycznych (Fig. 16) wykorzystujących zmutowane Lon pozbawione wybranych domen, tym samym różniących się masą cząsteczkową (od 21.4 do 87.4 kDa) stosowano taką samą wagową ilość Lon (μ g). Czy nie powinno się stosować równomolowych ilości (jak stosowano w SPR (Fig. 15)) i wtedy porównywać aktywność.
- Czy brak zaobserwowanego oddziaływania Lon- α -kazeina i Lon-IbpB (Fig. 23) mógł wynikać z aktywności proteolitycznej Lon zależnej od Mg^{2+} , niezależnej od ATP (wg badań Su 2016 Structure 24, 676–686).
- Czy badano, czy białka produkowane z plazmidów pLon w komórkach BL21 są w całości rozpuszczalne i nie wytracają się w części w ciałkach inkluzyjnych? Czy ewentualne zmiany w rozpuszczalności Lon i jego mutantów mogły wpłynąć na wynik analiz lokalizacji Lon w komórkach *E. coli* (Table 4)?
- Dlaczego na rysunku 36(iv) i 36(v) nie widać dwóch szczytów DNA, podczas gdy widać dwa szczyty Lon?
- W rozdziale „Discussion” Doktorantka przytacza dane nieopublikowane („Hoppe, unpublished”, str. 111), mówiące o tym, że fragmenty DNA niezawierające iteronów nie

stymulowały proteolizy TrfA przez Lon. Czy DNA wykorzystywane przez Doktorantkę, stymulujące aktywność proteolityczną Lon względem TrfA, zawierało iterony?

- Białko Lon *Brevibacillus thermoruber* oddziałuje z DNA przez subdomenę α , a białko Lon *E. coli* przez subdomenę α/β . Czy można te różnice przedyskutować w kontekście strukturalnym, funkcjonalnym i filogenetycznym?
- Niektóre szczegóły na niektórych rycinach mogłyby być dokładniej/konsekwentniej oznaczane, np. miejsce PvuI na rycinie 12 powinno być zaznaczone również na produkcie PCR; miejsce BamHI w rzeczywistości nie znika podczas klonowania, a na rysunku po klonowaniu już go nie ma. Warto w tym miejsc dodać, że obecnie nie używa się już kursywy do opisu enzymów restrykcyjnych (Nucleic Acids Res. 2003 Apr 1; 31(7): 1805–1812.).
- Procedura „site directed mutagenesis” (Methods, rozdz. 10.3) nie jest wystarczająco dokładnie opisana, nawet uwzględniając opis w wynikach (Results, rozdz. 1.7.1). Np. czytelnik musi się domyślać, że prawdopodobnie mutageneza polegała na powieleniu całych wektorów w reakcji PCR z wykorzystaniem starterów wprowadzających mutacje. Brak jest informacji o ligacji takiego produktu.
- Zauważyłam nieliczne nieścisłości merytoryczne i językowe np., „DNA loading buffer” nie jest w rzeczywistości buforem, a został zamieszczony w dziale bufory (Materials, rozdz. 6); ostatni etap reakcji PCR został nazwany „termination” (Methods, rozdz. 4), podczas gdy nie jest to etap zakańczania reakcji a raczej dosyntezowania końców przez polimerazę w miejscach, w których nie zostało to właściwie zrobione w poszczególnych cyklach (w j. angielskim zwykle etap ten nosi nazwę „final extension”); określenie, że wektory „pLon Δ N and pLon Δ P we initially constructed using TA cloning proceder. However, no positive clones were selected” (Results, rozdz. 1.4.2) nie jest stosowne, bo nie udało się uzyskać klonów zawierających plazmidy; ilość matrycy w przypadku reakcji PCR na polimerazie Pfu Turbo została opisana jako „60 g” (Methods, rozdz. 4). Błędy te wynikają ze skrótów myślowych, żargonu laboratoryjnego i oczywistych omyłek pisarskich i nie umniejszają wartości pracy.
- W rozdziale „Materials” zastanawia celowość wymieniania pochodzenia wielu odczynników wykorzystywanych w pracy, bez podania numeru katalogowego lub dokładnej ich charakterystyki. Same informacje o producencie/sprzedawcy danego odczynnika najczęściej niewiele mówią, ale też zwykle nie są istotne dla prezentowanych wyników. Uważam, że wymieniane powinny być tylko te odczynniki, które mogą być kluczowe dla osiągniętych wyników, ale za to z podaniem możliwie szczegółowych informacji (np. dotyczy to przeciwciał, które w pracy Doktorantki określone są dość zdawkowo i nie pozwalają na jednoznaczne zdefiniowanie materiału). Na spisywanie wszystkiego najzwyczajniej szkoda czasu. Podobna uwaga dotyczy sprzętu wykorzystywanego w pracy. Ponadto można dyskutować z przydatnością zebrania składu buforów i odczynników w jednym miejscu w rozdziale „Materials” (rozdz 6) i rozdzielenia ich od opisu metod, w których są wykorzystywane. Taki układ sprawia, że trudniej korzystać z opisu procedury i wymaga kartkowania pracy w trakcie zapoznawania się z procedurą, przy czym często bufor jest


charakterystyczny dla danej metody i bardziej naturalne jest zamieszczenie go zaraz pod opisem. Wirowanie powinno być opisane w wartościach względnej siły odśrodkowej RCF („x g”) a nie w liczbie obrotów na minutę („rpm”), szczególnie jeśli nie są podane informacje dotyczące rotorów.

- Jeśli wykorzystywane w pracy są wektory lub materiały niekomercyjne, o których informacje nie są łatwo dostępne, to powinny być zamieszczone w pracy stosowane opisy lub w przypadku plazmidów mapy i sekwencje (np. pET-SUMO-MCS- nie wiadomo jaki MCS został wprowadzony do komercyjnego wektora, a wektor został użyty do klonowania).

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Karłowicz mogę stwierdzić, że zawiera cenne naukowo i nowatorskie wyniki naukowe. Część wyników została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie naukowym Journal of Biological Chemistry 292(18):7507-7518 (Doktorantka jest pierwszym autorem, pierwsze autorstwo współdzielone z dr K Węgrzyn). Podkreślić też należy różnorodność technik wykorzystywanych w badaniach, ogrom pracy włożony w wykonanie badań, staranność wykonania i opisanie analiz.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Anny Karłowicz spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dn. 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym, a dorobek kandydatki uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Wnoszę zatem wniosek do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani Mgr Anny Karłowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników, ich potencjał poznawczy wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o wyróżnienie rozprawy.

Dr hab. Anna Pawlik



Zakład Mikrobiologii IPTD PAN