



Wrocław 8 grudnia 2017 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Karłowicz
"Analiza strukturalno-funkcjonalna proteazy Lon z *Escherichia coli* –
identyfikacja miejsca wiązania DNA"

Utrzymanie integralności proteomu jest jednym z fundamentalnych procesów zapewniających życie organizmu. Każdy z polipeptydów będących składową proteomu pełni swoją funkcję w określonym miejscu i czasie. Homeostaza białkowa, nazywana również proteostazą, jest utrzymywana przez białka opiekuńcze oraz enzymy proteolityczne. Proteazy degradujące uszkodzone lub nieprawidłowo zwinięte białka, chronią komórki przez agregatami, jak również usuwają cząsteczki, które spełniły już swoją funkcję.

Białka z nadrodziny AAA+ (ATPazy związane z różnymi procesami komórkowymi) pełnią różnorakie funkcje komórkowe. Biorą one udział w takich procesach jak: proteoliza, rozwijanie białek, transport membranowy, rearanżacja cytoszkieletu, biogeneza organelli, replikacja i naprawa DNA oraz ruch wewnątrzkomórkowy. ATP-zależne proteazy zostały odkryte w bakteriach na początku lat osiemdziesiątych w *E. coli*. W następnych latach odkryto białka homologiczne w innych bakteriach, archeonach, jak również organellach takich jak mitochondria, chloroplasty oraz peroksosomy.

Już wczesne badania proteazy Lon (białka z rodziny ATPaz) wykazały, że wiąże ono DNA. Jednak pomimo ponad trzydziestu lat badań, nie jest znane miejsce wiązania DNA, ani rola jaką pełni. Przeprowadzone przez panią mgr Annę Karłowicz badania, miały na celu poznanie własności strukturalnych oraz funkcjonalnych kompleksów proteazy Lon z kwasami nukleinowymi. Praca została wykonana pod opieką prof. dr hab. Igora Koniecznego, jednego z najlepszych w Polsce specjalistów zajmujących się molekularnymi mechanizmami replikacji DNA.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 133 strony. Została ona podzielona na tradycyjnie rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki oraz Dyskusję. Ponadto praca zawiera Streszczenie, Wykaz skrótów oraz Bibliografię.

Wstęp zajmuje 19 stron. Autorka rozpoczyna go opisem AAA+ ATPaz występujących w bakteriach, omawia schemat budowy domenowej oraz struktury przestrzenne tych białek. Następnie, pokrótce opisuje białka: ClpXP, ClpAP, ClpYQ, Lon oraz FtsH. W kolejnej części Wstępu, doktorantka omawia szczegółowo mechanizmy rozpoznania, rozwijania i translokacji substratu oraz jego degradacji. Dalej, autorka przedstawia historię odkrycia proteazy Lon, próby określenia jej struktury przestrzennej, mechanizm rozpoznawania, rozwijania i degradacji substratów oraz oddziaływania z DNA. Wstęp kończy omówienie roli biologicznej proteazy Lon, jej udziału w degradacji nieprawidłowo zwiniętych lub uszkodzonych białek, mechanizmie SOS, cyklu komórkowym oraz kontroli plazmidowego DNA.

Wstęp jest napisany w sposób logiczny i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematem rozprawy. Rozdział Materiały i Metody zawiera imponującą ilość technik, które doktorantka szczegółowo omawia. W rozdziale Wyniki Pani mgr Karłowicz w sposób czytelny i logiczny opisuje wykonane przez siebie eksperymenty, a dyskusja stanowi bardzo dobry komentarz do przeprowadzonych badań.

Do najważniejszych wyników otrzymanych przez mgr Annę Karłowicz zaliczam:

1. Otrzymanie rekombinowanej bakteryjnej proteazy Lon oraz jej trzech wariantów delecyjnych zawierających pojedyncze domeny oraz dwóch wariantów pozbawionych N- lub C-terminalnych domen. Autorka określiła ich zdolności wiązania DNA (za pomocą techniki SPR) oraz aktywności proteolitycznej. Na podstawie otrzymanych wyników autorka pracy wywnioskowała, że za oddziaływanie z DNA odpowiadają pozytywnie naładowane aminokwasy w domenie ATPazowej proteazy.
2. Zaprojektowanie oraz otrzymanie wariantów białka Lon z podstawieniami alaninowymi w miejscu potencjalnego oddziaływania z DNA. Miejsca podstawień zostały wybrane na podstawie modelu białka. Przeprowadziła pomiary oddziaływania z DNA za pomocą SPR, oraz określiła zdolność tworzenia kompleksów z DNA za pomocą AFM dla otrzymanych wariantów alaninowych oraz z podstawieniami do kwasów glutaminowych (druga grupa mutein). Ponieważ podstawienia do ujemnie naładowanych aminokwasów wpływały znacząco na aktywność białka Lon, w kolejnych eksperymentach autorka pracy poszukiwała przyczyn zmiany jego aktywności. Przeprowadziła proteolizę białek TrfA, IbpA oraz IbpB oraz pomiary oddziaływania z TrfA. Na ich podstawie autorka wysuwa wniosek, że warianty białka Lon z podstawieniami do kwasu glutaminowego nie są aktywne proteolitycznie w obecności DNA. Dodatkowo, analiza aktywności wariantów alaninowych (na długiej skali czasu) wykazała, że wariant z podwójnym podstawieniem posiada słabą aktywność proteolityczną.

3. Zaobserwowanie znacząco podwyższonej aktywności ATPazowej wariantu białka Lon z czterema podstawieniami do kwasu glutaminowego.
4. Przeprowadzenie eksperymentów *in vivo* celem określenia aktywności wariantów proteazy Lon z podstawieniami glutaminowymi. Autorka wykazała, że w przeciwieństwie do typu dzikiego białka, muteiny w znacznej mierze nie kolokalizują się z DNA bakteryjnym. Ponadto wykazała, że kształt komórek, w których zachodzi ekspresja mutantów glutaminowych białka Lon przypomina te, które nie posiadają białka Lon.
5. Wykazanie, że wariant białka posiadający cztery podstawienia glutaminowe ma negatywny efekt na stabilność plazmidu mini-RK w bakteriach. W przeciwieństwie wariant posiadający trzy podstawienia ma aktywność podobną do typu dzikiego białka.
6. Wykazanie stanu oligomerycznego (dodekameru) proteazy niezależnie od obecności Mg^{2+} lub $ATP\gamma S$. Stan oligomeryczny określono za pomocą ultrawiwiania.
7. Otrzymanie niskorozdzielczej struktury przestrzennej oligomerów proteazy z użyciem mikroskopii elektronowej. Otrzymana struktura pozwoliła zweryfikować model otrzymany narzędziami bioinformatycznymi.
8. Określenie wpływu Mg^{2+} lub $ATP\gamma S$ na wiązanie DNA przez białko Lon. Doświadczenia zostały przeprowadzone z użyciem frakcjonowania w gradiencie sacharozy oraz AFM. Zaobserwowano znaczący wpływ jonów magnezu lub magnezu i ATP na formowanie kompleksów. Ponadto, za pomocą ultrawiwiania autorka podjęła próbę określenia stanu oligomerycznego proteazy w obecności DNA.
9. Wykazanie, że białko Lon podlega translokacji na DNA wg. model ślizgowy. W celu potwierdzenia sposobu przemieszczania się proteazy wykonała szereg eksperymentów z użyciem AFM oraz filtracji żelowej. Ponadto zaobserwowała, że wiązanie białka Lon do DNA jest zależne od stopnia skręcenia DNA oraz, że białko to nie oddziałuje z jednoniciowym DNA.

Na podstawie licznych eksperymentów doktorantka stawia hipotezę, o zależności aktywności proteolitycznej białka Lon od jego stopnia oligomeryzacji. Ponadto sugeruje, że po związaniu DNA powstaje forma heksametyczna, która przesuując się po DNA degradowuje kompleksy nukleoproteinowe.

Moje uwagi oraz pytania

1. Widma doichroizmu kołowego wariantów proteazy Lon (rys 18B) moim zdaniem wykazują znaczne odchylenia w stosunku do białka typu dzikiego, proszę o komentarz.
2. Jakie były wydajności otrzymywania rekombinowanych białek użytych w pracy ?

3. Dlaczego nie zastosowano innej, niż w opisanej w rozprawie, metody oznaczania stężenia otrzymanych rekombinowanych białek (np. przez pomiar absorpcji przy 280 nm) ?
4. Czy poprawność zwinięcia rekombinowanych białek była ustalana również w inny sposób, poza pomiarem widm dichroizmu kołowego ? Zachowanie struktur drugorzędowych nie musi być zgodne z zachowaniem struktury trzeciorzędowej lub czwartorzędowej białka.
5. Jak długi odcinek DNA wiąże białko Lon ? Czy można by wyznaczyć powinowactwo DNA do białka Lon stosując np. oligonukleotydy ?
6. W jaki sposób proteazy o aktywności ATPazowej mogą degradować bardzo termodynamicznie stabilne białka, np. z organizmów hipertermofilnych ? Czy są dane literaturowe na ten temat ?
7. Czy w komórkach bakteryjnych mogą występować białka (lub związki typu polifosforany), które oddziałując z proteazą Lon (w miejscu tworzenia kompleksu z DNA), aktywowałyby je ?
8. W obrazach mikroskopowych obserwuje się trzy dominujące stany oligomeryczne. Jaki był ich procentowy udział ?

Podsumowując, należy podkreślić, że autorka pracy wykonała bardzo dużą ilość eksperymentów i uzyskała wartościowe wyniki, które pozwalają lepiej zrozumieć biologiczną rolę białka Lon.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr Anny Karłowicz "Analiza strukturalno-funkcjonalna proteazy Lon z *Escherichia coli* – identyfikacja miejsca wiązania DNA" jest bardzo wysoka, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami.

Wnoszę o dopuszczenie przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr Anny Karłowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoki poziom przedstawionej pracy oraz opublikowanie jej wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Z poważaniem



Daniel Krowarsch