



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

dr hab. Anna Pawlik
Laboratorium Biologii Molekularnej Mikroorganizmów
Tel. 071-3709949
e-mail: anna.pawlik@hirszfeld.pl

Wrocław, 07. 01.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Elżbiety Zabrockiej pt.:
„Motywy strukturalne białka TrfA niezbędne do tworzenia kompleksów z DNA”

Rozprawa doktorska mgr Elżbiety Zabrockiej dotyczy charakterystyki białka TrfA inicjującego replikację plazmidu RK2. Została wykonana pod opieką prof. Igora Koniecznego, w zespole, który specjalizuje się m.in. w badaniu inicjacji replikacji plazmidów.

Białko TrfA należy do rodziny białek inicjatorowych, których głównym zadaniem jest zapoczątkowanie replikacji DNA. Inicjatory replikacji DNA rozpoznają określony region DNA, wiążą się z nim, a następnie samodzielnie, lub przy udziale innych białek, doprowadzają do rozplecenia dwuniciowego DNA i umożliwiają utworzenie aparatu syntezującego potomne nici. Pomimo wieloletnich badań nad procesem inicjacji replikacji DNA, wciąż nie do końca poznane są molekularne podstawy oddziaływania inicjatorów z DNA, a przede wszystkim mechanizm otwarcia helisy DNA. Białka inicjatorowe, pomimo podobnego schematu inicjowania replikacji, różnią się budową i mechanizmem działania w zależności od rodzaju cząsteczki DNA, której replikację inicjują (np. plazmid, chromosom) i królestwa, do którego należy dany organizm (inicjatory: DnaA bakterii, Orc1/Cdc6 archeonów czy ORC eukariontów). Pewne istotne różnice w budowie czy aktywności inicjatorów zaobserwowano również na poziomie gatunków czy rodzaju plazmidu, którego replikację inicjują. TrfA i oriV plazmidu RK2 są jednym z modeli badawczych procesu inicjacji replikacji plazmidów, a w szerszym kontekście replikacji DNA. Dlatego badania podjęte przez Doktorantkę są uzasadnione i wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych, oryginalnych prac naukowych.

Rozprawa mgr Elżbiety Zabrockiej ma formę klasyczną. Została przygotowana starannie oraz zawiera wszystkie elementy i treści niezbędne do jej rzetelnej oceny. W rozdziale „Wstęp” Doktorantka przedstawia tematykę związaną z białkami inicjatorowymi chromosomów i plazmidów bakterii, oraz chromosomów archeonów i eukariontów, w szczególności w kontekście strukturalno-funkcjonalnym. W rozdziale „Cel Pracy” Doktorantka zwięźle, bo w 1 zdaniu, określa cel swoich badań, chociaż uzasadnienie podjęcia tematu pracy stanowi ostatni akapit rozdziału „Wstęp” i jego przesunięcie do rozdziału „Cel Pracy” byłoby wskazane. Rozdziały „Materiały” i „Metody” szczegółowo opisują wykorzystywany materiał badawczy i stosowane techniki. Rozdział „Wyniki”, a następnie

„Dyskusja”, stanowią główną część pracy. Całość dopełniają streszczenia rozprawy w języku polskim, wykaz skrótów oraz spis cytowanej literatury przedmiotu. Do kompletności rozprawy brakuje jednak rozdziału zawierającego najważniejsze wnioski.

Celem pracy podjętej przez Doktorantkę była analiza motywów strukturalnych białka TrfA niezbędnych do oddziaływania z DNA. **Najistotniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki to:**

- Zidentyfikowanie nowej domeny białka TrfA. Do tej pory znane były dwa motywy strukturalne TrfA, WH1 i WH2 (ang. *winged helix*), odpowiednio wiążące DNA i odpowiedzialne za dimeryzację białka. Domena odkryta przez Doktorantkę została nazwana WH3.
- Scharakteryzowanie aktywności domeny WH3, która, jak wykazała Doktorantka, jest odpowiedzialna za oddziaływanie TrfA z DNA.
- Wykazanie różnej roli domen WH2 i WH3 w oddziaływaniu z DNA: domena WH3 oddziałuje zarówno z dwuniciowym DNA (iteronami dsDNA) jak i jednoniciowym DNA (13-merami dolnej nici oriV), natomiast domena WH2 oddziałuje z wyższym powinowactwem z dsDNA niż ssDNA.
- Wykazanie, że w zależności od liczby iteronów, domeny WH3 i WH2 mogą być nierównocennie zaangażowane w oddziaływanie z DNA. Jak wykazała Doktorantka, domena WH2 oddziaływała głównie z jednym iteronem, a WH3 z fragmentem DNA zawierającym 5 iteronów.
- Wyznaczenie sekwencji peptydów, w obrębie których dochodzi do oddziaływania z ssDNA i dsDNA
- Scharakteryzowanie mutacji przywracających aktywność wiązania DNA wariantom TrfA niezdolnym do oddziaływania z DNA (P151S/E361K, A171T/P314S, przy czym warianty TrfA P151S i P314S nie wiążą DNA). Zdolność wariantów P151S/E361K, A171T/P314S do oddziaływania z DNA i replikacji DNA została scharakteryzowana *in vitro* i *in vivo*, porównana z białkiem typu dzikiego oraz wariantami niewiązącymi DNA lub wiążącymi DNA z wyższym powinowactwem niż białko dzikie.
- Określenie istotnej roli R327 w wiązaniu ssDNA, R347 w wiązaniu dsDNA oraz każdego z tych aminokwasów w replikacji DNA *in vitro* i *in vivo*.
- zidentyfikowanie motywu RnnKK jako uniwersalnego motywu istotnego dla oddziaływania TrfA z DNA.
- Zaproponowanie modelu TrfA oraz modelu oddziaływania TrfA z iteronami oriV plazmidu RK2

Wyniki przedstawione przez Doktorantkę są przekonujące, najczęściej dobrze udokumentowane, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu. Zaznaczyć należy, że, aby osiągnąć zamierzone cele badawcze, Doktorantka zastosowała szereg technik *in vitro* i *in vivo*, które pozwoliły na scharakteryzowanie domen TrfA oraz wyznaczenie peptydów/aminokwasów TrfA zaangażowanych w oddziaływanie z DNA. Współpraca z grupą prof. Bujnickiego umożliwiła Doktorantce przeprowadzenie modelowania

komputerowego struktury TrfA oraz opracowanie modelu oddziaływania TrfA-DNA, które znakomicie dopełniają część eksperymentalną pracy.

Po przeczytaniu rozprawy nasunęły mi się następujące uwagi i pytania dotyczące pracy:

- **Ad Wstęp:** chociaż Doktorantka przedstawia najistotniejsze cechy inicjatorów replikacji, do ich pełniejszej charakterystyki brakuje informacji opublikowanych w ostatnich kilku latach. Większość cytowanych w rozprawie prac została opublikowana przed 2010 rokiem, podczas gdy w ostatnim okresie wyjaśniono wiele aspektów dotyczących mechanizmów inicjacji replikacji DNA. Być może dlatego we Wstępie pracy znalazło się wiele nieścisłości lub informacji, które już zostały zweryfikowane w badaniach z ostatnich lat, np.: niewielu autorów przywołuje już motyw zamka leucynowego jako motywu ważnego dla oddziaływania domeny I białka DnaA (str. 12), protomery DnaA nie oddziałują przez domenę IV (str.29), kompleks ORC nie uczestniczy w rozplataniu DNA (str. 33). Uzupelnienie danych o najnowsze wyniki badań na pewno pozwoliłoby Doktorantce uniknąć tego typu uchybień.

Ad Materiały, Metody:

- Rozdz. 4.3.2, str. 38: Dlaczego sekwencje oligonukleotydów „Iterony nici górnej” i „Iterony nici dolnej” nie są homologiczne, a są używane jako dsDNA w SPR?
- Rozdz. 4.4.1, Str. 42: Bufory D1 i HA mają ten sam skład i są używane do oczyszczania tego samego białka, więc powinny mieć tę samą nazwę
- Rozdz. 5.6, str. 48: w opisie przygotowania komórek kompetentnych powinno być zaznaczone, że komórki DH5 α posiadają plazmid odporny na ampicylinę, inaczej ich hodowla w pożywce z antybiotykiem (ampicyliną) nie ma sensu, bo szczep DH5 α nie ma oporności na ampicylinę.
- Rozdz. 5.15, str. 53: jednostka 1 RU odpowiada związaniu 1 pg substratu (ligandu/analitu) na 1 mm² powierzchni sensora, a nie jak błędnie podano 1 pg/mm² substratu. Czy sprawdzano, że TrfA nie wiąże dsDNA niespecyficznie zanim zastosowano tylko kanał pusty jako kontrolę oddziaływania TrfA z dsDNA?

Ad Wyniki:

- Ryc. 13D, str. 64:, nie opisano co na rysunku oznacza K+
- Rozdz. 6.1.3 str. 65: Doktorantka napisała, że obserwowany wzrost bakterii syntezujących TrfA A171T był większy niż bakterii syntezujących niezmutowane białko TrfA, natomiast na Ryc. 13B jest to trudne do oceny. Co oznacza określenie „wzrost był większy” w opisie wzrostu kolonii bakterii na płytkach? Czy stosowano inne metody mierzenia wzrostu bakterii?
- Rozdz. 6.2.1 str. 71: nie pokazano wyników izolacji białek w systemie SUMO (żeli SDS-PAGE), zamieszczono tylko informację, że preparaty białek charakteryzowały się czystością >90% i podano ich stężenia.
- Ryc. 16, str. 72: na dwóch pierwszych sensogramach od lewej widać tylko 4 lub 3 krzywe, a według legendy stosowano 5 stężeń białka TrfA (podobny problem np. na Ryc. 27: 5 stężeń tylko dla niezmutowanego TrfA, 4 stężenia wariantów, podobnie Ryc. 28, Ryc. 34)
- Rozdz. 6.2.2. str. 72: Doktorantka porównuje oddziaływanie wariantów białek TrfA wyizolowanych z metką SUMO z białkiem dzikim TrfA izolowanym z metką His-tag. Czy jest to

uprawnione? Czy eksperymenty te wykonane zostały w tym samym czasie, na tym samym sensorze? Z mojego doświadczenia z białkiem DnaA wynika, że pomimo zachowania podobnych warunków analiz SPR, wyniki różnią się między eksperymentami, szczególnie jeśli wykonywane są na różnych biosensorach (np. inna ilość DNA mogła zostać związana w każdym z eksperymentów).

- Rozdz. 6.3 str. 74 oraz Rozdz. 6.6 str. 90: Doktorantka napisała, że nie zaobserwowała istotnych różnic w oddziaływaniu TrfA ze modyfikowanymi oligonukleotydami DNA. Czy wykonywano analizy densytometryczne i porównawcze, ponieważ trudno jest określić efektywność wiązania „na oko” na podstawie Ryc. 18 i Ryc. 29 (np. porównać WT do 35T). Na Ryc. 18 nie opisano stężeń TrfA (ścieżki od 2 do 10 to stężenia od 1 do 56 μ M TrfA, ale nie określono krotności rozcieńczenia). Podobna uwaga do Ryc. 29.
- Rozdz. 6.4 str. 80: nie pokazano wyników analizy GMSA TrfA ze znakowanym dsDNA; podobna uwaga do opisu analizy GMSA ze znakowanym ssDNA na str. 92.
- Ryc. 28, str. 89: dlaczego w przypadku białka SUMO TrfA 140-190 P151S otrzymano ujemne wartości sensogramów?
- Rozdz. 6.5 str. 89: Doktorantka napisała, że zaobserwowała marginalne wiązanie białka SUMO TrfA WH1WH2 do jednoniciowego DNA, podając wartość 70 RU i porównując ją z wartością 110 RU dla białka SUMO TrfA 140-190, które wiąże ssDNA. 70 RU stanowi 63% wartości sygnału białka wiążącego ssDNA, dlatego nie powinno się tego wiązania określać marginalnym. Rysunek jest zbyt mały żeby można było samodzielnie ocenić wartości RU.

Ad Dyskusja

- Str. 103: Zdanie „Wyniki eksperymentalne potwierdzają wiarygodność uzyskanego z użyciem technik bioinformatycznych, modelu kompleksu nukleoproteinowego TrfA z DNA, a model potwierdza wyniki eksperymentów *in vivo* oraz *in vitro*” jest zapętającym się potwierdzeniem wyników. Wydaje mi się, że lepiej byłoby napisać, że wyniki modelowania i wyniki eksperymentalne są zgodne.
- Str. 111: Doktorantka podała, że w pracy Dueber i wsp., 2011 stwierdzono, że DnaA *A. aeolicus* oddziałuje z ssDNA wyłącznie za pośrednictwem domeny III. Jest to prawda, tylko że w pracy badano oddziaływanie skróconego wariantu białka składającego się z domen III-IV, natomiast nie badano oddziaływania domeny I z ssDNA. Wcześniejsza praca Abe i wsp., 2007 J. Biol. Chem. 282(24):17816-27 wskazywała na udział domeny I w oddziaływaniu z ssDNA, ale problem ten nie został do końca wyjaśniony.
- Str. 112: Doktorantka napisała, że „Nieznane są dane dotyczące oddziaływania pomiędzy jednoniciowym DNA a białkami ORC z Archea i Eukarya. Można przypuszczać, że białka te mogą oddziaływać zarówno poprzez domenę WH jak i motyw ISM znajdujący się w domenie AAA+, jak to ma miejsce w przypadku DnaA. Należy jednak podkreślić, że struktura motywu ISM jest różna w białkach ORC Archea i Eukarya (...) niż w białku DnaA”. Czy Doktorantka może podać przykłady sugerowanych oddziaływań między składnikami ORC i ssDNA i z jakich lat pochodzą dane? Czy hipotezy nie uległy zmianie w związku z obecną teorią, która mówi, że kompleks ORC oddysocjuje od helikazy MCM zanim helikaza MCM, w kompleksie z Cdc45 i

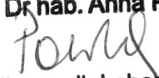
GINs (tzw. kompleks CMG), rozplecie dwuniciowe DNA (np. Parker i wsp., Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2017 52(2):107-144, Rys 1)?

Ponadto w pracy zauważyłam drobne błędy edytorskie, niedopowiedzenia czy błędne określenia, np.:

- Rysunki przedstawiające wyniki SPR oraz niektóre struktury białek są często zbyt małe (np. Rys. 2, 16, 28). Ich powiększenie zdecydowanie poprawiłoby czytelność danych, a tylko w niewielkim stopniu zwiększyło objętość pracy.
- Nieścisłości merytoryczne, np.: str. 12: domena I DnaA ma ok. 75-110 aminokwasów, a nie jak podała Doktorantka 57; str. 13: rozwinięcie skrótu AAA+ to *ATPases associated with diverse cellular activities*; problem z numeracją aminokwasów w peptydach np., str. 92: peptyd AMPNDTAR opisany jako 148-156 aminokwasów, ale prolina powinna znajdować się w pozycji 151, natomiast z wyliczeń wynika, że w peptydzie jest to pozycja 150
- Nieprecyzyjnych lub nieprawidłowych określeń, np.: str. 15: „dane ograniczają się do trzech kryształów uzyskanych dla białka RepE (...) białka π (...) oraz domeny WH1 białka RepA” powinno brzmieć „dane ograniczają się do kryształów uzyskanych dla trzech białek: RepE (...) białka π (...) oraz domeny WH1 białka RepA”; „ w bruździe większej znajdującej się na DNA” powinno być „ w bruździe większej DNA”, czy podobnie w podpisie Ryc. 36 „domeny WH oddziałują z nukleotydami znajdującymi się na bruździe większej nici DNA” jest nieprawidłowym sformułowaniem, bo nie ma nici większej i mniejszej; str 37: „pAT388-wektor (...), powstały o plazmid pNN388” powinno być „pAT388-wektor (...), powstały na bazie (na podstawie) plazmidu pNN388”; „pET-SUMO (...), wektor powstały w oparciu o bakteriofaga T7” nie jest prawidłowe, z bakteriofaga T7 wykorzystano sekwencję promotora i terminatora transkrypcji; str. 48: „Komórki zawieszano w jałowym glicerolu w końcowym stężeniu 30%” powinno brzmieć „Komórki zawieszano w jałowym glicerolu o końcowym stężeniu 30%” lub prościej „Komórki zawieszano w jałowym 30% glicerolu”, nazwa archeobakterie nie jest już używana, została zastąpiona nazwą archeony.
- Niektórych cytowanych prac nie ma w spisie literatury np. Kawakami i wsp. 2015 (str. 106), Cheng i wsp. 2015 (str. 110), Marchler-Bauer i wsp., 2011 (str. 111)

Wyżej wymienione uchybienia przytaczam z obowiązku recenzenta głównie po to, żeby zwrócić uwagę Doktorantki na szczegóły, które są trudne w dopracowaniu, ale istotne dla perfekcji całości pracy. Nie umniejszają one w żaden sposób wartości merytorycznej pracy, która zawiera cenne naukowo i nowatorskie wyniki naukowe, które zapewne niedługo zostaną opublikowane.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Mgr Elżbiety Zabrockiej spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dn. 14 marca 2003 r o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy 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 Elżbiety Zabrockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Pawlik

Kierownik Laboratorium
Biologii Molekularnej Mikroorganizmów