

**Prof. dr hab. Maria Koziółkiewicz,**  
*Instytut Biochemii Technicznej*  
*Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności*  
*Politechnika Łódzka*  
ul. Stefanowskiego 4/10  
90-924 Łódź

---

Łódź, 20 października 2014r.

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Anety Kuroń na temat:  
„Prymaza DnaG jako potencjalne miejsce docelowe dla nowych tuberkulostatyków”

Praca doktorska mgr inż. Anety Kuroń została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Dziadka w Pracowni Genetyki i Fizjologii Mycobacterium Instytutu Biologii Medycznej PAN i dotyczy charakterystyki prymazy DnaG jako potencjalnej cząsteczki docelowej dla nowych preparatów przeciwgruźliczych. Zespół prof. Dziadka od lat poszukuje białek mykobakteryjnych, które ze względu na swe właściwości, zdecydowanie różne od właściwości podobnych białek eukariotycznych, mogłyby stanowić cząsteczki docelowe dla nowych tuberkulostatyków.

Jak wskazują wyniki dotychczasowych badań, struktury prymaz czyli polimeraz RNA, które syntezują krótkie fragmenty RNA niezbędne jako startery do zainicjowania procesu replikacji DNA, są różne w przypadku enzymów pochodzenia bakteryjnego oraz enzymów archeonów i eukariontów. Różnice te Doktorantka opisała szczegółowo w części teoretycznej rozprawy. O właściwościach mykobakteryjnych prymaz wiadomo stosunkowo niewiele, tym bardziej w chwili gdy mgr Aneta Kuroń rozpoczęła realizację swojego projektu doktorskiego. Celem jej badań była analiza aktywności enzymatycznej mykobakteryjnej prymazy dnaG, ponieważ tego typu charakterystyka była konieczna dla rozpoczęcia poszukiwań ewentualnych inhibitorów tego enzymu. Biorąc pod uwagę fakt, iż w genomach mykobakterii obecny jest nie tylko gen kodujący prymazę DnaG, ale także cztery geny kodujące podobne do eukariotycznych prymazy AEP, Doktorantka chciała przede wszystkim sprawdzić czy enzym DnaG jest niezbędny dla inicjacji replikacji DNA, czy też jego funkcję mogą przejąć

prymazy AEP. Do badania niezbędności prymazy DnaG zastosowała model genetyczny oparty o rekombinację homologiczną, pozwalający na selekcję pojedynczych i podwójnych krzyżowych rekombinantów. Jako narzędzia genetyczne wykorzystowała skonstruowane przez siebie plazmidy. Wykazała, iż prymaza DnaG jest niezbędna dla mykobakterii i nie może być zastąpiona ani przez prymazę DnaG z *E. coli* ani prymazy AEP. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazywały następny etap badań mgr Kuroń. Skoro prymaza DnaG jest niezbędna dla replikacji mykobakterii, może stanowić docelową cząsteczkę dla ewentualnych nowych leków przeciwgruźliczych, a więc zasadne są poszukiwania inhibitorów tego enzymu. Poszukiwania te musiały być poprzedzone charakterystyką biochemiczną mykobakteryjnej prymazy DnaG, a realizacja tego zadania wymagała skonstruowania systemu ekspresyjnego pozwalającego na nadprodukcję i oczyszczenie tego enzymu. Doktorantka otrzymała prymazę DnaG w postaci dwóch preparatów: jako białko z *M. smegmatis* (z metką histydynową) oraz białko z *M. tuberculosis* (jako białko fuzyjne z transferazą S-glutationową).

Niewątpliwie było to jedno z bardziej pracochłonnych zadań zrealizowanych przez Doktorantkę. Szczególnie godne podkreślenia jest skonstruowanie ponad 30 plazmidów koniecznych do potwierdzenia niezbędności prymazy DnaG i otrzymania jej preparatów wykorzystanych w dalszych etapach badań.

Otrzymanie preparatów białka DnaG umożliwiło Doktorantce przeprowadzenie wielu istotnych eksperymentów i analiz, w tym badania aktywności prymazy DnaG a także immunizacji zwierząt doświadczalnych i pozyskania poliklonalnych przeciwciał przeciw białku DnaG<sub>M5</sub>. Uzyskanie tych przeciwciał pozwoliło z kolei określić do jakiego stopnia możliwe jest obniżenie poziomu prymazy DnaG przy zachowaniu w miarę normalnego wzrostu i przeżywalności komórek mykobakterii. Ten etap badań został przez Doktorantkę dobrze zaplanowany i zrealizowany, a uzyskane wyniki mają istotne znaczenie dla pełnej charakterystyki enzymu. Pani mgr Kuroń wykazała, iż obniżenie poziomu prymazy DnaG nawet o 80% nie wpływa w sposób istotny na obniżenie wzrostu i przeżywalności mykobakterii, co może oznaczać, iż ewentualne inhibitory prymazy muszą być niezwykle efektywne, aby skutecznie hamować aktywność tego enzymu.

Kolejny etap badań miał na celu ocenę aktywności prymazy DnaG w obecności różnych matryc DNA oraz różnych jonów metali dwuwartościowych. Doktorantka zidentyfikowała 16-nukleotydowy oligonukleotyd jako najkrótszą matrycę, na której możliwa jest synteza startera. Zidentyfikowała także sekwencję nukleotydową tej matrycy. Tę część

eksperymentów przeprowadzono w obecności jonów magnezu. Jednak dalsze eksperymenty wykazały, iż obecność jonów manganu wyraźnie zwiększa aktywność enzymu, a sekwencja nukleotydowa matrycy przestaje mieć znaczenie dla enzymu, który w tych warunkach katalizuje syntezę startera niezależnie od sekwencji matrycy.

Lektura tej części pracy wywołuje jednak pewien niedosyt. Doktorantka wykazała, iż sprawnie posługuje się metodą elektroforetycznej analizy produktów reakcji znakowanych radioaktywnym [<sup>32</sup>P]UMP, ale nie określiła długości powstających oligorybonukleotydów, a bywała ona różna w zależności od enzymu i warunków reakcji. Co jednak ważniejsze, nie doprowadziła do końca analiz dotyczących roli jonów metali. Wiadomo (choćby z cytowanej w rozprawie publikacji Rymera i wsp.), iż prymazy, podobnie jak inne polimerazy, działają zgodnie z mechanizmem określanym jako „two metal ion mechanism of action”. Jeden z jonów metalu aktywuje atak grupy 3'-hydroksylowej startera na atom fosforu α cząsteczki NTP i stabilizuje stan przejściowy, a drugi ułatwia odejście grupy opuszczającej czyli cząsteczki pirofosforanu. Skoro mangan, inaczej niż magnez, ma tak silny wpływ na obniżenie specyficzności enzymu co do matrycy, to może warto byłoby mieszać sole magnezu i manganu w stosunku 99:1, 49:1, 19:1, itp. i zbadać przebieg reakcji i jej produkty. Nie wiemy, co prawda, jakie jony (magnezu czy manganu) uczestniczą w tej reakcji w warunkach *in vivo*, ale jest spore prawdopodobieństwo, że przynajmniej jednym z nich jest jon manganu. W pracy Rymera jest mowa o tym, że jony magnezu i manganu są „interchangeable”, ale publikacja ta dotyczy prymazy ze *S. aureus* i nie wiemy czy podobna sytuacja ma miejsce w przypadku mykobakterii. Gdyby w reakcji katalizowanej przez mykobakterijną prymazę DnaG uczestniczył(y) jon(y) manganu, to prawdopodobnie identyfikacja długości i sekwencji nukleotydowej matrycy nie miałaby większego znaczenia praktycznego, ale mogłaby stanowić ciekawy element charakterystyki samego enzymu. Uważam, że z poznawczego punktu widzenia badania te dostarczyły wielu interesujących wyników, ale nie sądzę aby okazały się one przydatne do planowania dalszych badań nad identyfikacją skutecznych inhibitorów prymazy DnaG.

Rola jonów metali została poruszona także w rozdziale 5.5, gdzie opisano analizę oddziaływań prymazy DnaG z jednoniciowym DNA: ...”W przypadku krótszych matryc zbadano, czy dodatek jonów  $Mn^{2+}$  lub mieszanki rybonukleotydów będzie miał wpływ na oddziaływanie białka z ssDNA. Wyniki analizy wykazały, że nawet w obecności jonów manganu (...) na matrycach DNA nie tworzą się kompleksy nukleoproteinowe.” Zgodnie z

mechanizmem zależnym od dwóch jonów metalu dwuwartościowego, takiego wyniku należało oczekiwać, bo jony metalu uczestniczą w akcie katalizy, a nie w procesie rozpoznawania i wiązania się do matrycy.

Rozprawa doktorska mgr inż. Anety Kuroń została napisana w sposób jasny i klarowny. Tekst został zredagowany bardzo starannie. Znalazłam zaledwie kilka niezręcznych sformułowań, które wymieniam poniżej:

Str.12: „*Pierwszy z nich zakłada istnienie dwóch odrębnych polipeptydów kodujących oddzielnie prymazę i helikazę...*”

Polipeptydy nie mogą niczego kodować, to geny kodują określoną sekwencję aminokwasową polipeptydów.

Str. 16: *...także w innych białkach zdolnych do wiązania jonów i transportu reszt fosforanowych...*”

Powyższy fragment zdania dotyczy takich enzymów jak prymazy i polimerazy, które wydłużają łańcuchy oligonukleotydowe na drodze nukleofilowego ataku grupy 3'-hydroksylowej startera na atom fosforu  $\alpha$  cząsteczki substratu NTP lub dNTP z odejściem pirofosforanu, ale nie możemy mówić, że enzymy te transportują grupy fosforanowe. To są, co prawda, transferazy, ale nukleotydylotransferazy a nie fosfotransferazy.

Str.20: „*...gen dnaG jest integralną częścią wielocząsteczkowego operonu.*”

Ani sam operon nie jest cząsteczką ani nie może być wielocząsteczkowy. Jest to fragment DNA zawierający z reguły kilka genów i kilka sekwencji regulatorowych.

Powyższe uwagi nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną opinię o pracy doktorskiej mgr inż. Anety Kuroń. Podsumowując, uważam tę rozprawę za interesującą i wartościową zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia. Dzięki dobrze przemyślanym i zaplanowanym eksperymentom Doktorantka wyjaśniła szereg aspektów działania mykobakteryjnej prymazy DnaG i stworzyła podstawy do dalszych badań mających na celu poszukiwanie efektywnych inhibitorów tego enzymu.

Stwierdzam, iż powyższa rozprawa odpowiada wymogom stawianym przez ustawę „O tytule naukowym i stopniach naukowych” i przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Anety Kuroń do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

M. Kuroń