

**Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Zuzanny Pakosz-Stępień
pt. „Characterisation of nonbacterial gyrases – from biochemical analysis,
through compound-enzyme interactions to structural biology”**

Rozprawa doktorska Pani mgr Zuzanny Pakosz-Stępień przedstawiona została w postaci tradycyjnego manuskryptu w języku angielskim. Spełnia to wymagania określone odpowiednimi przepisami dotyczącymi tego typu dysertacji. Niemniej, zgodnie z przepisami oraz instrukcją otrzymaną od Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, recenzja ta sporządzona jest w języku polskim do celów procedowania postępowania doktorskiego.

Doktorantka podjęła się ważnego i ambitnego zadania – charakterystyki gyraz pochodzących z innych organizmów niż bakterie. Enzymy tej klasy występują bowiem głównie w komórkach bakteryjnych, ze względu na kolistą postać ich genomów oraz specyficzną aktywność enzymatyczną gyraz, polegającą na wprowadzeniu negatywnych superskrętoń w DNA. Niemniej gyrazy występują także w komórkach niektórych archeonów i protistów, stąd zbadanie właściwości tych właśnie enzymów jest ważne nie tylko dla badań podstawowych, ale także z praktycznego punktu widzenia, np. użycia ich jako potencjalnych celów terapeutycznych. Opieka naukowa Pana dr hab. Jonathana Hoddle (promotora) oraz miejsce wykonywania pracy (Uniwersytet Jagielloński) stwarzały znakomite warunki do przeprowadzenia badań.

Pierwotnym celem badań Pani mgr Zuzanny Pakosz-Stępień było określenie właściwości gyrazy z *Plasmodium falciparum* oraz poszukiwania specyficznych inhibitorów tego enzymu jako potencjalnych leków przeciwko malarii. Niestety o ile nadekspresja genu kodującego podjednostkę B (GyrB) tego enzymu oraz nadprodukcja i oczyszczanie tego białka zakończyły się powodzeniem, o tyle analogiczne próby w przypadku podjednostki A (GyrA) nie przyniosły zakładanych efektów. Badania prowadzone były w związku z tym z użyciem hybrydowego białka, zawierającego podjednostkę GyrA z bakterii *Escherichia coli* oraz podjednostkę GyrB z *Plasmodium falciparum*. Badania zmierzające do znalezienia specyficznych inhibitorów takiego enzymu doprowadziły do wytypowania dwóch związków – alizaryny S oraz purpurogaliny, z których ten drugi został dokładniej scharakteryzowany jako potencjalny lek przeciw-malaryczny.

Ponieważ w toku prac nie udało się uzyskać natywnej gyrazy z *Plasmodium falciparum* (w związku z brakiem sukcesów w nadprodukcji podjednostki GyrA), w kolejnym etapie badań, zamiast charakterystyki strukturalnej i funkcjonalnej tego białka, Doktorantka skupiła się na analogicznej analizie enzymu pochodzącego z archeonu *Archaeoglobus sulfaticallidus*. Kompleksowe analizy struktury tego enzymu doprowadziły do ciekawych wniosków dotyczących jego budowy. Bardzo interesujące były także doświadczenia sugerujące, że badana gyraza potrafi relaksować pozytywnie superskręcone cząsteczki DNA bez wykorzystania ATP. Taka aktywność, według dotychczasowej wiedzy, nie występuje u gyraz. Niemniej Pani mgr Zuzanna Pakosz-Stępień uzyskała wyniki doświadczeń sugerujące, że relaksacja pozytywnie superskręconego DNA bez wykorzystania ATP możliwa jest także w przypadku gyrazy z *Escherichia coli*. Są to szczególnie intrygujące wyniki, które mogłyby zburzyć dotychczasowe dogmaty dotyczące aktywności biochemicznej gyraz. Wymagają one oczywiście dodatkowych badań i dyskusji, niemniej na pewno są niezwykle stymulujące.

Podkreślić należy stosowanie przez Doktorantkę nowoczesnych metod z zakresu biologii molekularnej i strukturalnej, co podnosi wartość pracy. Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane, z wykorzystaniem odpowiednich kontroli. Interpretacja wyników jest również rozważna, a dyskusja przeprowadzona z uwzględnieniem dotychczasowej wiedzy w zakresie tematu pracy.

Tak ciekawa rozprawa nie mogła oczywiście nie wzbudzić mojego zainteresowania i nasunięcia się pytań, które chciałbym przedyskutować z Doktorantką podczas obrony pracy doktorskiej. Po pierwsze, intrygujące jest dlaczego nie udało się efektywnie nadekspymować genu kodującego podjednostkę GyrB z *Plasmodium falciparum*. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić różne hipotezy dlaczego tak się stało? Czy rozważane było użycie zarówno innych wektorów ekspresyjnych jak i innych gospodarzy? Być może białko GyrB z *Plasmodium falciparum* jest toksyczne dla bakterii, które były używane w doświadczeniach? Czy rozważne było użycie innych organizmów w celu nadprodukcji tego białka (np. drożdże, bakulowirusy, komórki chemiczne, lub inne)?

Jeszcze bardziej intrygujące było uzyskanie wyników, które mogą sugerować, że możliwa jest relaksacja pozytywnie superskręconego DNA przez gyrazę bez wykorzystania ATP. Dotychczas uważa się bowiem, że taka reakcja nie zachodzi przy braku tego nukleotydu. Czy Doktorantka mogłaby zaproponować hipotezę wyjaśniającą dlaczego inni badacze nie byli wcześniej w stanie wykryć takiej aktywności? Czy była brana pod uwagę ewentualność zanieczyszczenia preparatów enzymatycznych uzyskanych w ramach prowadzonych badań niewielkimi ilościami ATP? Enzymy oczyszczane były z komórek zawierających ten związek, a jako białka wiążące ATP gyrazy mogły potencjalnie zawierać resztkowe ilości związanego nukleotydu. Za taką ewentualnością mogłyby także przemawiać wyniki zaprezentowane w pracy, wskazujące, że w przypadku gyrazy z *Archaeoglobus sulfaticallidus* relaksacja pozytywnie superzwinętego DNA bez dodawania ATP nie była widoczna przy 10 nM stężeniu enzymu, podczas gdy przy dwukrotnie większym

stężeniu (20 nM) widoczna była całkowita relaksacja. Takie „skokowe” pojawienie się aktywności mogłoby sugerować, że jeśli preparat zawierał szczątkowe ilości ATP, to aktywność gyrazy uwidaczniała się dopiero po przekroczeniu jakiegoś bardzo niskiego progu stężenia tego nukleotydu (nieosiągalnego w preparacie o stężeniu enzymu 10 nM). Ponieważ gyraza działa jako enzym, nawet niewielka jego aktywność (albo bardziej precyzyjnie – aktywność niewielkiej frakcji cząsteczek enzymu obecnego w mieszaninie reakcyjnej) może doprowadzić do całkowitej relaksacji DNA jeśli inkubacja trwa dostatecznie długo (co w przypadku enzymu można oznaczać minuty). Warto zwrócić uwagę, że efektywność relaksacji negatywnie superzwiniętego DNA przez tę samą gyrazę była proporcjonalna do użytego stężenia enzymu, a wiadomo, że taka aktywność gyrazy nie wymaga obecności ATP. Poproszę Doktorantkę o komentarz i własną opinię na ten temat.

Obok dyskusji merytorycznej, mam również kilka uwag natury redakcyjnej oraz drobnych uwag odnoszących się do treści pracy, które wymienię poniżej.

1. Na str. 19 czytamy o „strukturze krystalograficznej” (*crystallographic structure*). Krystalografia jest metodą badawczą, natomiast określa się strukturę kryształów badanego związku, zatem jest to struktura krystaliczna, a nie krystalograficzna (muszę nadmienić, że poprawna nazwa stosowana jest w innych fragmentach pracy).
2. Na str. 32 Doktorantka pisze, że „wszystkie organizmy pasożytnicze (...) mają złożony cykl życiowy, który obejmuje dwa typy gospodarzy”. Jest to nieścisłość, gdyż takie stwierdzenie dotyczy wielu, ale nie wszystkich pasożytów – są znane pasożyty, które rozwijają się tylko w jednym gatunku gospodarza.
3. Na str. 54 czytamy, że „plazmid był transformowany do komórek”. Transformacja oznacza zmianę cech (w przypadku organizmu biorcy). Nie można zatem „transformować plazmidu do komórek” – to komórki



- mogą być transformowane plazmidami (czyli mogą zmieniać cechy pod wpływem obecności w nich plazmidu).
4. Na str. 78 czytamy, że „oba białka były klonowane do wektora pET-28a” (*both proteins were cloned into the pET-28a vector*). pET-28a jest plazmidem, zbudowanym z DNA. Nie można zatem cząsteczki białka klonować do DNA plazmidowego. Chodziło oczywiście nie o białka, ale o geny kodujące te białka – niemniej należy zwracać uwagę na precyzję języka naukowego.
 5. W spisie literatury wiele pozycji zawiera niepełne dane bibliograficzne (np. brak nazwy czasopisma, brak nr woluminu, brak nr stron lub nr artykułu). Dotyczy to m.in. pozycji nr: 25, 28, 29, 32, 35, 44, 55, 83, 121, 127, 128, 159, 166, 175, 191.

W podsumowaniu uważam, że Pani mgr Zuzanna Pakosz-Stępień przedstawiła ciekawą pracę doktorską. Lektura wstępnego rozdziału pracy wskazuje, że wykazała się Ona wiedzą teoretyczną z zakresu prowadzonych badań. Opis części eksperymentalnej i interpretacja wyników pokazują, że Doktorantka ma umiejętności prowadzenia prac naukowych i rozwiązywania problemów naukowych. Stwierdzam zatem, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Na podstawie powyższego, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Zuzanny Pakosz-Stępień do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn

**Review of the PhD thesis by
Zuzanna Pakosz-Stępień, MSc
entitled “Characterisation of nonbacterial gyrases – from biochemical analysis,
through compound-enzyme interactions to structural biology”**

The PhD thesis by Zuzanna Pakosz-Stępień is presented in the form of a traditional manuscript in English. This meets the requirements set out in the relevant regulations for this type of dissertation. Nevertheless, in accordance with the regulations and instructions received from the Chairperson of the Biological Sciences Discipline Council of the Jagiellonian University, the formal review was prepared in Polish for the purpose of proceeding with the doctoral procedure, and this is its English version.

The candidate undertook an important and ambitious task - the characterization of gyrases from organisms other than bacteria. Enzymes of this class are found mainly in bacterial cells, due to the circular form of their genomes and the specific enzymatic activity of gyrases, consisting in the introduction of negative supercoils in DNA. Nevertheless, gyrases are also found in the cells of some archaea and protists, therefore the study of the properties of these enzymes is important not only for basic research, but also from a practical point of view, for example, their use as potential therapeutic targets. Scientific supervision of Dr. Jonathan Hoddle (supervisor) and the place of work (Jagiellonian University) created excellent conditions for conducting this research.

The primary aim of research by Zuzanna Pakosz-Stępień was to determine the properties of gyrase from *Plasmodium falciparum* and to search for specific inhibitors of this enzyme as potential drugs against malaria. Unfortunately, while the overexpression of the gene encoding the B subunit (GyrB) of this enzyme and the overproduction and purification of this protein were successful, similar attempts in the case of the A subunit (GyrA) did not bring the expected results. Therefore, the research was conducted using a hybrid protein containing the GyrA subunit from *Escherichia coli* and the GyrB subunit from *Plasmodium falciparum*. Research aimed at finding specific inhibitors of such an enzyme led to the selection of two compounds - alizarin S and purpurogalin, the latter of which has been more precisely characterized as a potential anti-malarial drug.

Since in the course of the work it was not possible to obtain native gyrase from *Plasmodium falciparum* (due to the lack of success in the overproduction of the GyrA subunit), in the next stage of research, instead of structural and functional characteristics of this protein, the PhD student focused on the analogous analysis of the enzyme from the archaeon *Archaeoglobus sulfaticallidus*. Comprehensive analyzes of the structure of this enzyme have led to interesting conclusions regarding its structure. Experiments suggesting that the studied gyrase is able to relax positively supercoiled DNA molecules without the use of ATP were also very interesting. Such activity, according to current knowledge, does not occur in gyrases. However, Zuzanna Pakosz-Stępień obtained experimental results suggesting that the relaxation of positively supercoiled DNA without the use of ATP is also possible in the case of *Escherichia coli* gyrase. These are particularly intriguing results that could demolish the existing dogmas regarding the biochemical activity of gyrases. Obviously, they require additional research and discussion, but they are certainly very stimulating.

It should be emphasized that the candidate has used modern methods in the field of molecular and structural biology, which increases the value of the work. The

experiments were well designed with appropriate controls. The interpretation of the results is also proper, and the discussion is carried out taking into account the existing knowledge in the field of the work topic.

Such an interesting dissertation did arouse my great interest and raised questions that I would like to discuss with the candidate during the defense of the doctoral thesis. First, it is intriguing why the gene encoding the GyrB subunit from *Plasmodium falciparum* could not be efficiently overexpressed. Could the candidate present different hypotheses as to why this happened? Have the use of both other expression vectors and other hosts been considered? Perhaps the GyrB protein from *Plasmodium falciparum* could be toxic to the bacteria that were used in the experiments? Was it considered to use other organisms to overproduce this protein (e.g. yeast, baculovirus, hamster cells, or others)?

Even more intriguing were the results that may suggest that it is possible to relax positively supercoiled DNA by gyrase without the use of ATP. Until now, it is believed that such a reaction does not occur in the absence of this nucleotide. Could the candidate propose a hypothesis explaining why other researchers have not been able to detect such activity before? Was the possibility of contamination of the enzyme preparations, obtained in the course of the research, with small amounts of ATP taken into account? Enzymes were purified from cells containing this compound, and as gyrase is an ATP binding protein, it could potentially contain residual amounts of bound nucleotide. This possibility could also be supported by the results presented in the dissertation, showing that in the case of gyrase from *Archaeoglobus sulfaticallidus*, the relaxation of positively supercoiled DNA without the addition of ATP was not visible at 10 nM enzyme concentration, while at twice the concentration (20 nM), complete relaxation was visible. Such a "spike" appearance of activity could suggest that if the preparation contained residual amounts of ATP, the gyrase activity was visible only after exceeding a very low threshold of this nucleotide concentration

(unachievable in the preparation with an enzyme concentration of 10 nM). Since gyrase acts as an enzyme, even a small amount of gyrase activity (or more precisely, the activity of a small fraction of the enzyme molecules present in the reaction mixture) can lead to complete relaxation of the DNA if incubation lasts long enough (which in the case of an enzyme can be minutes). It is worth noting that the relaxation efficiency of negatively supercoiled DNA by the same gyrase was proportional to the enzyme concentration used, and it is known that such gyrase activity does not require the presence of ATP. I would like to ask the candidate for her comment and her own opinion on this subject.

In addition to the substantive discussion, I also have a few editorial comments and minor comments regarding the content of the work, which I will list below.

1. On page 19 we read about "crystallographic structure". Crystallography is a research method, but the structure of the crystals of the investigated compound is determined, so it is a crystal structure, not a crystallographic structure (I must mention that the correct name is used in other parts of the work).
2. On page 32, the candidate wrote that "all parasitic organisms (...) have a complex life cycle that includes two types of hosts". This is an inaccuracy, as this statement applies to many, but not all parasites - there are known parasites that develop in only one host species.
3. On page 54 we read that "the plasmid was transformed into cells". Transformation means a change in characteristics (of the recipient organism). Therefore, it is not possible to "transform a plasmid into cells", but cells can be transformed with plasmids (i.e. they can change their characteristics under the influence of the presence of a plasmid in them).

4. On page 78 we read that "both proteins were cloned into the pET-28a vector". pET-28a is a plasmid made of DNA. Thus, a protein molecule cannot be cloned into plasmid DNA. It wasn't about proteins, of course, but about the genes that encoded those proteins - but one should pay attention to the precision of scientific language.
5. In the bibliography, many items contain incomplete bibliographic data (e.g. no journal name, no volume number, no page numbers or article number). This applies to following references: 25, 28, 29, 32, 35, 44, 55, 83, 121, 127, 128, 159, 166, 175, 191.

In conclusion, I believe that Zuzanna Pakosz-Stępień presented an interesting doctoral thesis. Reading the introductory chapter of the work indicates that she demonstrated theoretical knowledge in the field of research. The description of the experimental part and the interpretation of the results show that the candidate has the skills to conduct research and solve scientific problems. Therefore, I declare that the doctoral dissertation presented to me for review meets the conditions set out in the Act of 20 July 2018 "Law on Higher Education and Science" (Journal of Laws of 2018, item 1668, as amended). On the basis of the above, I am applying to the Biological Sciences Discipline Council of the Jagiellonian University to admit Zuzanna Pakosz-Stępień to the further stages of the procedure for conferring a doctoral degree in the field of exact and natural sciences, in the discipline of biological sciences.



prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn