

Prof. Jarosław Poznański  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5A, 02 106 Warszawa

Warszawa 22 grudnia 2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Kochańczyka pt.**

***„Charakterystyka biofizyczna i funkcjonalna domeny haczyka cynkowego białka Rad50 i jego homologów”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Tomasza Kochańczyka została wykonana w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod opieką prof. dr hab. Artura Krężela. Należy zaznaczyć, że promotor jest uznanym specjalistą w badaniach nad rolą jonów metali w układach biologicznych, przy czym znaczącą część Jego dorobku stanowią publikacje dotyczące roli jonów cynku (wg bazy WoS 33 publikacje cytowane łącznie ponad 1100 razy). Można więc domniemywać, że przedłożona rozprawa jest fragmentem szerszego planu badawczego realizowanego w Zakładzie Chemii Biologicznej Uniwersytetu Wrocławskiego.

W układach biologicznych cynk jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych metali przejściowych – w organizmie człowieka jego całkowitą ilość szacuje się na ok. 2g, a więc niemal tyle, co żelaza. Co więcej, obok np. żelaza miedzi, manganu, jest tak zwanym pierwiastkiem istotnym. Jego wysokie powinowactwo do łańcuchów bocznych aminokwasów, głównie histydyny i cysteiny, sprawia, że w kontakcie z białkami czy peptydami praktycznie nie występuje w stanie wolnym, co znacznie utrudnia prowadzenie pomiarów termodynamicznych nawet w przypadku prostych układów modelowych. Interesująca jest także dwojaka rola cynku: może on stanowić zarówno kofaktor niezbędny dla aktywności katalitycznej (np. w dysmutazie ponadtlenkowej) jak i stanowić niezbędny element strukturalny białek (np. w domenie palca cynkowego, czy badanej przez Doktoranta domenie haczyka cynkowego). Należy nadmienić, że jon cynku może zostać związany przez bardzo odległe w sekwencji reszty aminokwasowe, co stanowi istotne wyzwanie dla metod identyfikacji *in silico* miejsc jego wiązania. W większości wypadków jego „wyrwanie” z białka powoduje znaczące zmiany w strukturze bądź dynamice konformacyjnej. Z tego powodu zamiana obsadzenia miejsca wiążącego cynk, podobnie jak to ma miejsce przypadku

motywów *EF-hand* wiążących jony wapnia, jest z ewolucyjnego punktu widzenia alternatywnym do modyfikacji potranslacyjnych sposobem przełączania między różnymi stanami białka. I właśnie dlatego, obok proteomu, którego wielkość wielokrotnie przewyższa liczbę białek kodowanych w genomie, w ostatnich latach przyjęło się pojęcie metalo-proteomu. Już z tego krótkiego wstępu jednoznacznie wynika, że prace prowadzone przez mgr Tomasza Kochańczyka dotyczą istotnych biologicznie problemów.

### **Formalna ocena rozprawy**

Forma przedłożonej 150-o stronicowej rozprawy jest w zasadzie zgodna kanonem. W skład rozprawy wchodzi kolejno spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, 27-o stronicowy stanowiący wprowadzenie w tematykę badań, cele pracy, opis użytych materiałów i stosowanych metod, 71-o stronicowy opis uzyskanych wyników, dyskusja wyników spis rycin i tabel oraz zawierający 218 pozycji spis cytowanej literatury (ok. 25% ma nie więcej niż 5 lat). Pracę uzupełniają lista dorobku naukowego Doktoranta (w skład którego wchodzi 5 publikacji oraz 16 doniesień konferencyjnych) oraz pokaźna lista źródeł finansowania przeprowadzonych badań. Do pracy zostały także dołączone odbitki czterech publikacji Doktoranta bezpośrednio związanych z tematem rozprawy. Sądzę, że załączony dorobek Doktoranta spełnia wymogi formalne na tzw. spinkę, aczkolwiek, w świetle ostatnich zawirowań w interpretacji prawa przez MNiSW oraz Sekretarza Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów, wybranie klasycznej formy rozprawy nie może dziwić. Rozprawa została napisana w języku polskim. Została zredagowana starannie, aczkolwiek autor nie ustrzegł się nielicznych, na szczęście, błędów. Co prawda w pracy Doktorant prezentuje imponującą ilość wyników doświadczalnych, ale ich upakowanie czasami wręcz uniemożliwia jakąkolwiek interpretację, jak to ma dla przykład miejsce na rycinach 7.27 i 7.28. Niektóre ze stosowanych przez Doktoranta metod zostały opisane bardzo lakonicznie. Tak w rozdziale „Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego” brak jest informacji o:

1. temperaturach, w których były rejestrowane widma,
2. wartościach stosowanych czasów saturacji,

3. metodzie pomiarów czasu relaksacji protonów amidowych, o ile nie nastąpiło przejście i w tekście chodziło o szybkość wymiany,

a WHATIF jest pakietem oprogramowania a nie algorytmem.

W rozdziale dotyczącym izotermicznej kalorymetrii miareczkującej brak jest informacji o liczbie nastrzyków (zakładam, że podana wartość 6.82 $\mu$ l jest objętością każdego nastrzyku) oraz o końcowym stosunku stężeń reagentów, którego nie można nawet oszacować, gdyż nie została podana objętość strzykawki. Nie ma także informacji o modelu oddziaływania użytym w analizie danych.

Z kolei widma spektrometrii mas pokazane na Rycinie 6.2 reprezentują raczej dane uzyskane po konwolucji różnych form jonowych, co, w odróżnieniu od Ryciny 6.5, nie zostało przed Doktoranta poprawnie opisane. Prosiłbym także Doktoranta o wyjaśnienie, czemu mogą odpowiadać mniejszościowe sygnały obserwowane na Rycinie 6.2 „na prawo” od sygnałów o oczekiwanych masach.

Mimo powyższych uchybień, poziom edytorski pracy, przynajmniej w moim odczuciu, można uznać za wysoki, a wzmiankowane wyżej uchybienia wynikają najprawdopodobniej z okazjonalnego kontaktu Doktoranta z opisywanymi metodami, co przynajmniej w przypadku spektroskopii NMR zostało *explicite* napisane.

### **Tematyka badań i cele rozprawy**

Oceniana praca przedstawia wyniki badań nad tzw. haczykiem cynkowym (*zinc hook*), który jest stanowi niedawno zidentyfikowaną domenę umożliwiającą zwiążanie jonu cynku przez dwa różne łańcuchy polipeptydowe. Domena taka, a może raczej ich para, może więc stanowić „sterowalny” czynnik dimeryzacyjny, który w porównaniu z powszechnie występującym i dobrze opisanym motywem splecionych helis, można traktować jako punktowy zawias.

Zgodnie z tytułem rozprawy, głównym celem pracy jest biofizyczna i funkcjonalna charakterystyka domeny haczyka cynkowego z białka Rad50. Postawiony cel należy uznać za niezwykle ambitny, łączący w jednym opracowaniu naukowym niezwykle szerokie spektrum metod badawczych. Zgodnie z przedstawionymi założeniami cel ten miał zostać osiągnięty w trzech dobrze określonych etapach. Celem pierwszego było wyznaczenie parametrów

termodynamicznych opisujących oddziaływanie modelowych peptydów o sekwencji zbliżonej do haczyka cynkowego oraz określenie czynników wpływających na stabilność badanych układów. Kolejnym celem była doświadczalna weryfikacja wiedzy uzyskanej na podstawie badań biofizycznych, w szczególności miała zostać zaprojektowana modyfikacja białka wymuszająca jego kontrolowaną dimeryzację sterowaną poprzez wiązanie jonów cynku. Celem ostatecznym było zastosowanie uzyskanej wiedzy do analizy fenotypów związanych z mutacjami w obrębie haczyka cynkowego białka Rad50.

Wielość metod prowadzących do realizacji założonych celów musi budzić szacunek. W badaniach czysto biofizycznych, Doktorant użył szerokiego zakresu metod optycznych (fluorescencja, spektroskopia UV-VIS, spektroskopia CD), które w połączeniu z pomiarami potencjometrycznymi, wspartymi precyzyjnymi pomiarami stężeń umożliwiły wyznaczenie szeregu istotnych parametrów termodynamicznych opisujących wiązanie cynku przez modelowe peptydy, które Doktorant najprawdopodobniej sam zsyntetyzował, aczkolwiek tekst rozprawy pisany w formie bezosobowej nie daje takiej pewności. Uzyskane dane zostały w sposób znaczący wzbogacone przez wyniki pomiarów ITC i NMR. Zastosowanie serii racjonalnie zaprojektowanych mutantów dodatkowo pozwoliło na wskazanie oddziaływań kluczowych dla stabilizacji kompleksu haczyka cynkowego. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie poprawki na entalpię protonacji/deprotonacji poszczególnych składników, która to procedura często jest pomijana, co może prowadzić do zafałszowania obserwowanej relacji między entropią a entalpią procesu. Należy mieć jednak na uwadze, że otrzymane parametry termodynamiczne dotyczą modelowych układów i nie można ich bezpośrednio przekładać na oddziaływanie między haczykami cynkowymi w dimerze białka Rad50, dla którego motyw splecionych helis być może występuje również w przypadku formy monomerycznej. Z tego powodu nasuwa mi się pytanie o przyczynę wyboru peptydu HK45, jako najlepszego modelu dla haczyka cynkowego. Zgrubna analiza struktury dostępnej w bazie PDB (1l8d) pozwala sądzić, że nieco dłuższy fragment (420-478) zapewni znacznie więcej kontaktów hydrofobowych w obszarze tzw. suwaka leucynowego, co mogłoby zmniejszyć entropowy koszt tworzenia kompleksu. Prosiłbym także Doktoranta o przedstawienie kryterium identyfikacji aminokwasów zaangażowanych w oddziaływanie między domenami, gdyż PDBePISA jest narzędziem, a nie algorytmem. Pytanie to jest o tyle istotne, że pobieżna analiza kontaktów zdefiniowanych odległości mniejsze niż suma

promieni wdW + 1Å wykazuje, że G428 nie bierze udziału w oddziaływaniu między domenami (K439 tworzy mostek solny z D429). Prosiłbym także Doktoranta o wskazanie możliwych źródeł rozbieżności między wartościami pKa wyznaczonymi różnymi metodami (Tabela 7.3)

Analiza funkcjonalności motywu haczyka cynkowego jako czynnika sterującego dimeryzacją białek została przeprowadzona na dla dwóch modelowych białek. Pomiar DLS (notabene nieopisane w części metodycznej) wykazały, że zastosowanie EDTA jako chelatora jonów Zn(II) powoduje zmniejszenie promienia hydrodynamicznego, co można potraktować jako indikator rozpadu dimerów. Należy jednak zaznaczyć, że różnice w rozkładach promieni hydrodynamicznych przedstawione na Rycinie 7.18 są niemal niezauważalne (podobnie zresztą jak opisy osi). Sugerowałbym równoległe pokazanie funkcji autokorelacji, dla której spodziewałbym się wyraźnych zmian towarzyszących procesowi rozpadu dimerów. Obecność sterowanej cynkiem dimeryzacji została jednak równoległe potwierdzona pomiarami anizotropii fluorescencji dla homodimerów oraz bezpromienistego transferu energii dla heterodimerów. Chciałbym w tym miejscu zwrócić uwagę, że zastosowany system hetero-FRET mógłby także posłużyć do określenia kinetycznej stabilności haczyka cynkowego.

W kolejnym etapie prac został przebadany wpływ mutacji białka Rad50 zlokalizowanych w obrębie domeny haczyka cynkowego na cynko-zależne tworzenie dimerów. Jako modele zostały zastosowane (oligo)peptydy zawierające 14, 41 i 130 reszt aminokwasowych. Stosując równoległe różne metody spektroskopowe Doktorant jednoznacznie wykazał, że wszystkie trzy wprowadzone mutacje w sposób istotny wpływają na preferowaną stechiometrię tworzonych kompleksów, co jednoznacznie wskazuje na możliwy mechanizm upośledzenia komórkowej aktywności badanych mutantów białka Rad50. Co więcej, zmiany aminokwasowe wprowadzone do badanych (oligo)peptydów zgodnie ze zidentyfikowanymi *in vivo* mutacjami supresorowymi nie wpłynęły znacząco na wiązanie Zn(II) dla krótszych peptydów, choć w przypadku przywracającego fenotyp mutantu L703F dla 130-o aminokwasowego fragmentu zaobserwowano, że udział struktur heliakalnych jest zbliżony do tego obserwowanego dla niezmienionej formy białka, choć jednak w znacznie mniejszym stopniu zależy od stężenia cynku. Efekt ten najprawdopodobniej odzwierciedlający molekularny mechanizm odzyskania aktywności

biologicznej przez białko Rad50-46-L703F, istotny jest także dla pokrewnego mutantu Rad50-48-L703F (co zostało już własnoręcznie stwierdzone przez Doktoranta) .

Ja widąc z powyższego opisu, Doktorant zrealizował wszystkie założone cele. Za jedne z najważniejszych ustaleń ocenianej pracy należy uznać określenie roli poszczególnych aminokwasów w stabilizacji haczyka cynkowego, a w szczególności ogromny zestaw wyznaczonych parametrów termodynamicznych. Ważna jest też dyskusja, a szczególnie jej końcowa część o implikacjach biologicznych przeprowadzona w kontekście współpracy z grupą prof. Petriniego. Pokazuje ona, w jaki sposób badania biofizyczne mogą posłużyć do interpretacji danych *in vivo*, a także do projektowania nowych wariantów białek umożliwiających badanie specyficznych ścieżek sygnałowych czy metabolicznych.

Kontekst biologiczny haczyka cynkowego został ograniczony wyłącznie do partnerów białka Rad50, czemu jednak nie należy się dziwić, gdyż w chwili obecnej jest to chyba jedyny dobrze opisany układ biologiczny zawierający domenę haczyka cynkowego.

Podsumowując, pracę doktorską mgr Tomasza Kochańczyka można uznać za wybitną, o czym niezależnie świadczy także wysoka ranga czasopism, w których jej części zostały już opublikowane. Właściwie można stwierdzić, że mgr Kochańczyk w znaczącym stopniu przyczynił się do opisanie nowej klasy oddziaływań międzycząsteczkowych – w bazie Web of Science zidentyfikowałem 18 prac dotyczących problematyki „Zinc hook”, z czego trzy są autorstwa Doktoranta. Sama rozprawa stanowi dowód biegłego opanowania przez Doktoranta nie tylko metod biofizycznych i biochemicznych umożliwiających termodynamiczne badanie układów białkowych, ale także procedur syntezy peptydów czy ekspresji, oczyszczania i modyfikacji białek. **W moim odczuciu, przedłożona praca z nadmiarem spełnia zarówno kryteria zwyczajowe jak i te formalne określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Tomasza Kochańczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, zarówno ze względu na wartość merytoryczną, jak i wagę publikacji autorstwa magistra Kochańczyka, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy.**

Jarosław Poznański

