



Dr hab. Marcin Nowotny

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Kochańczyka „Charakterystyka biofizyczna i funkcjonalna domeny haczyka cynkowego białka Rad50 i jego homologów”.**

Praca doktorska mgr Tomasza Kochańczyka została wykonana, pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężela. Tematem pracy są badania motywu haczyka cynkowego białek Rad50 z archeowca i drożdży. Białka te są kluczowe dla naprawy dwuniciowych pęknięć DNA – jednych z najgroźniejszych uszkodzeń materiału genetycznego. Mechanizm ich działania nie jest w pełni poznany. Rad50 tworzy dimeryczne koliste struktury. Dwa punkty zamknięcia okręgu do dimeryzacja domeny ATPazy na jednym końcu wydłużonej cząsteczki Rad50 oraz dimeryzacja tzw. haczyka cynkowego na drugim końcu cząsteczki. Haczyk cynkowy to intrygujący mały motyw z dwoma resztami cysteiny, którego dimeryzacja zachodzi poprzez koordynację jonu cynku. Biorąc pod uwagę znaczenie biologiczne Rad50 oraz ciekawe własności strukturalne haczyka cynkowego, tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta jest istotna i atrakcyjna.

Główne części przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej to wstęp teoretyczny, opis materiałów i metod, opis badań własnych oraz dyskusja. Struktura tekstu nie odbiega zatem od tradycyjnego układu. Wprowadzenie teoretyczne jest napisane przejrzysto, zawiera starannie przygotowane i pomocne w śledzeniu tekstu ryciny. Wstęp zawiera wszystkie elementy istotne dla zrozumienia tematyki pracy, wprowadza czytelnika we własności białek wiążących cynk oraz własności i funkcję białek Rad50 i ich kompleksów.



Dobre przygotowanie Wstępu rozprawy świadczy o dużej wiedzy doktoranta oraz umiejętności analizy literatury. Część informacji ze Wstępu została opublikowana, jako artykuł przeglądowy (Kochańczyk T. i wsp. *Metallomics*, 2014).

Część metodyczna jest dobrze opisana. Powtórzenie doświadczeń na podstawie tego opisu nie powinno nastęrczać trudności. W badaniach własnych Doktoranta zawraca uwagę niezwykle szeroki wachlarz zastosowanych metod. W ich zakres wchodzą synteza organiczna peptydów, charakterystyka chemiczna, termodynamiczna i biofizyczna (miareczkowania potencjometryczne, spektropolarymetryczne, kompetycyjne, kalorymetria, pomiary fluorescencji), przygotowanie konstruktów ekspresyjnych, oczyszczanie białek metodami chromatograficznymi, czy badania genetyczne drożdży. Podczas realizacji opisanych badań, Doktorant opanował podejścia doświadczalne, które są bardzo cennym połączeniem metod na pograniczu chemii i biologii.

Jakość merytoryczną prac własnych doktoranta oceniam bardzo wysoko. Jest to dodatkowo potwierdzone przez fakt, że większość z zamieszczonych w pracy wyników jest już opublikowana, a co za tym idzie została zweryfikowana przez innych specjalistów w tej dziedzinie. Mgr Kochańczyk jest pierwszym autorem trzech prac doświadczalnych opublikowanych w *Chemical Communications*, *Scientific Reports* i *Analytical Chemistry* oraz drugim autorem pracy opublikowanej w *Molecular Cell*. Jest też pierwszym autorem pracy przeglądowej w *Metallomics*. Jest to znakomity dorobek dla badacza na tym etapie kariery.

W wynikach opisano charakterystykę chemiczną i biofizyczną haczyka cynkowego z białka Rad50 z archeowca *P. furiosus*. Wybór tego białka był podyktowany tym, że dla jego domeny haczyka cynkowego dostępna jest struktura krystaliczna. W serii badań uzyskano

wyniki, które pokazały istotną rolę deprotonacji reszt cysteiny w wiązaniu cynku i tworzeniu dimeru haczyka cynkowego, wykazały kluczowe dla tworzenia struktury tej domeny elementy strukturalne łącznie z pomiarem ich wkładów termodynamicznych do stabilności domeny. Wyniki tych prac są spójne i prezentują kompletny i szczegółowy obraz mechanizmu tworzenia struktury haczyka cynkowego. Interesujące jest to, że przed związaniem jonów cynku znacząca część tej domeny jest nieustrukturyzowana.

Kolejna część pracy opisuje zastosowanie minimalnego haczyka cynkowego z mutacją zwiększającą stabilność dimeru, jako metki promującej dimeryzację białek. Z sukcesem zastosowano tę metkę do uzyskania dimerycznych form białek fluorescencyjnych, których wiązanie ze sobą potwierdzono metodami FRET. Na uwagę zasługuje fakt, że podejście to zostało już wykorzystane przez innych badaczy do stworzenia genetycznie kodowanych sond fluorescencyjnych do mierzenia wewnątrzkomórkowego stężenia jonów cynku (Chen Z i Ai H, Anal. Chem., 2016). Sondy te mają znacznie lepsze własności niż opracowane do tej pory. Świadczy to o tym, że wyniki doktoranta zostały już wykorzystane przez innych badaczy.

Trzecia część pracy to opis badań haczyka cynkowego z drożdżowego białka Rad50, w tym w szczególności jego wariantów, które zostały wyizolowane w badaniach genetycznych drożdży przez współpracowników grupy, w której pracuje Doktorant. Warianty te charakteryzują się upośledzeniem funkcji białka Rad50 w naprawie i sygnalowaniu dwuniciowych pęknięć DNA. Zastosowano tu podejście częściowo podobne do tego z pierwszej części pracy. Wykazano, że substytucje negatywnie wpływające na funkcje białka Rad50 prowadzą do zaburzenia struktury haczyka cynkowego i jego dimeryzacji. Mutacje supresorowe wyizolowane w drożdżach nie znoszą tych defektów. Ich działanie nie polega na



przywróceniu poprawnej dimeryzacji haczyka, a raczej na przywróceniu poprawnej konformacji domeny superhelikalnej Rad50. Pozostaje niejasne zachowanie badanych białek w doświadczeniach filtracji żelowej. Na przykład białko ScHK130 nie zmienia znacząco profilu elucji z kolumny filtracji żelowej po dodaniu jonów cynku (Ryc. 7.35a), co jest spodziewane przy tworzeniu zależnego od cynku dimeru. Może to wynikać z nietypowego, odbiegającego od globularnego kształtu cząsteczki białka, ale może też świadczyć o bardziej skomplikowanych procesach, na przykład tworzeniu się multimetrów domeny haczyka. Chciałbym prosić dyskusję tych wyników oraz propozycje dalszych badań, które pozwolą je dalej wyjaśnić. To czego zabrakło mi w tej części pracy, to próba strukturalnej analizy efektów zarówno mutacji zaburzających funkcje haczyka jak i mutacji supresorowych. Chciałbym prosić, aby podczas obrony doktorant odniósł się do tego. Czy można przygotować miarodajny model homologiczny drożdżowego haczyka cynkowego i na tej podstawie zaproponować wyjaśnienie efektu mutacji oraz zaplanować doświadczenia, które te wyjaśnienia przetestują?

Bardzo intrygujące jest możliwość tworzenia dwóch typów kompleksów Rad50 – kolistego dimeru zamkniętego przez dimeryzację domen ATPazowych oraz dimeryzację haczyków cynkowych oraz kolistego tetrameru zamkniętego dimeryzacją domen ATPazowych w których dwie połowy tetrameru są połączone przez haczyki cynkowe. Te formy mogą pełnić różne funkcje w komórce. Zdaję sobie sprawę, że to jest bardzo trudne pytanie, ale prosiłbym Doktoranta, aby podczas obrony przedyskutował, czy badania struktury przedstawione w rozprawie sugerują modyfikacje haczyka cynkowego, które pozwoliłyby specyficznie promować powstawanie jednej lub drugiej formy? Modyfikacje takie byłyby nieocenionym narzędziem do badania funkcji białka Rad50.

Od strony edytorskiej praca została przygotowana starannie – szczególnie zwraca uwagę skrupulatne przygotowanie rycin, które są dopracowane graficznie i przejrzyste. Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o dwóch drobnych niedociągnięciach – w rycinie 4.3 zabrakło informacji z jakich struktur pochodzą przedstawione płace cynkowe, a w Rycinie 7.2 sekwencja ostatniego peptydu (PAVA) jest nieprawidłowa. Praca jest napisana poprawnym językiem a doktorant sposób zrozumiały opisuje wykonane badania.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania naukowe na wysokim poziomie technicznym i merytorycznym. Stanowi ważny wkład w zrozumienie mechanizmu działania domeny haczyka cynkowego białka Rad50 oraz, ogólniej, roli jaką pełni cynk w strukturach białek. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Tomasza Kochańczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, bardzo istotne pole badań oraz sukces publikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

*Marcin Nowotny*

Dr hab. Marcin Nowotny