

Gdańsk, 11.05.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Michała Padjaska**  
**pt.: „Wpływ dynamiki koordynacyjnej Zn(II) na strukturę domeny haczykowej białka**  
**Rad50”**

Pan mgr Michał Padjasek wykonał pracę doktorską pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Artura Krężela w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Przedmiotem rozprawy były badania strukturalne domeny haczyka cynkowego białek Rad50, będących istotnym ogniwem szlaku naprawczego podwójnych pęknięć nici DNA. Praca ta stanowi cenny wkład do dorobku będącego efektem badań roli jonów cynku w kontroli szeregu procesów komórkowych, które są prowadzone w zakładzie prof. Artura Krężela.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 160 stron i składa się z następujących rozdziałów: „Wstęp” (24 strony), „Cel pracy” (2 strony), „Materiały i metody” (25 stron), „Wyniki i dyskusja” (65 stron), „Konkluzje” (8 stron), „Bibliografia” (154 pozycje). Ponadto praca zawiera wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń oraz streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Układ pracy nie budzi zastrzeżeń.

Praca poprzedzona jest zwartym, dobrze napisanym „Wstępem”, w którym Doktorant krótko przedstawił rodzaje uszkodzeń DNA, szlaki ich naprawy oraz wpływ jonów Cd(II) na uszkodzenia DNA. Autor znacznie szerzej opisał ścieżki naprawy podwójnych pęknięć nici DNA zwracając szczególną uwagę na kompleks MRN/X - odpowiedzialny za rozpoznawanie i naprawę tych pęknięć, białko Rad50 - stanowiące rdzeń kompleksu MRN/X oraz domenę haczykową białka Rad50 - będącą miejscem wiązania jonów Zn(II). Ta część pracy dobrze przygotowuje czytelnika do rozdziału, w którym Doktorant omawia wyniki badań własnych.

Celem recenzowanej pracy było pozyskanie nowych danych strukturalnych i biofizycznych na podstawie badań domen haczyka cynkowego białek Rad50 pochodzących z trzech organizmów - *H. sapiens*, *S. cerevisiae* oraz *P. furiosus* - które umożliwiłyby: określenie struktury domeny haczyka cynkowego w białkach organizmów eukariotycznych; wyjaśnienie

roli trzeciej reszty Cys w obrębie motywu wiążącego jony Zn(II); poznanie sposobu w jaki domena haczyka cynkowego może przekazywać sygnały allosteryczne do części globularnej kompleksu MRN/X (i w drugim kierunku) oraz ocenę możliwości podstawienia jonu Zn(II) w kompleksie haczyka jonem Cd(II). W mojej opinii problem badawczy został trafnie zdefiniowany a metody badawcze odpowiednio dobrane.

Realizację części doświadczalnej pracy Doktorant rozpoczął od syntezy i oczyszczania niezbędnych do badań peptydów i białek. Niektóre reakcje wymagały optymalizacji warunków np. ligacja znakowanych fluorescencyjnie dipeptydów z fragmentami haczyka cynkowego. Sądzę, że zestawienie w postaci listy czy tabeli otrzymanych związków wraz z przypisanymi im symbolami ułatwiłoby znacznie lekturę tej pracy.

W kolejnej części pracy Doktorant w ramach współpracy z grupą prof. Yunje Cho, zajmował się badaniami strukturalnymi domeny haczyka cynkowego ludzkiego białka Rad50, które doprowadziły do rozwiązania jej struktury krystalicznej, oraz udało się potwierdzić występowanie analogicznej konformacji w roztworze wykorzystując wyniki analizy spektrofluorymetrycznej.

Realizując postawione przed sobą cele Doktorant przeprowadził badania struktury domeny haczyka cynkowego białka Rad50 z drożdży *S. cerevisiae*, w których wykazał, że struktura dimeru drożdżowego haczyka cynkowego prezentuje konformację rozwartą, w przeciwieństwie do struktury ludzkiego homologu, i jest bardziej zbliżona do klasycznej struktury białka z organizmu *P. furiosus*. Ponadto Doktorant wykazał, że drożdżowy haczyk cynkowy wiąże dwa jony Zn(II) z istotnie odmiennym powinowactwem, a wiązanie każdego z nich niesie za sobą globalne zmiany w strukturze łańcucha peptydowego. Ponadto Pan mgr Michał Padjasek na podstawie badań wariantu domeny haczykowej pozbawionego dodatkowej reszty Cys, którą zastąpił resztą Gly (mutacja C686G), udowodnił, że dodatkowa reszta odpowiada za dynamikę strukturalną domeny haczyka, która poprzez dostarczenie kolejnego donora siarkowego umożliwia przyłączenie drugiego jonu Zn(II) w mononuklearnym kompleksie haczyka Zn(Hk)<sub>2</sub> i uformowanie binuklearnego centrum Zn<sub>2</sub>S<sub>6</sub>, tym samym generując kompleks Zn<sub>2</sub>(Hk)<sub>2</sub>. Transformacja formy mononuklearnej do formy binuklearnej domeny haczyka cynkowego wiąże się z nożycowym ruchem regionów superhelikalnych

protomerów Rad50 – z formy otwartej do formy zamkniętej – i sugeruje możliwość zależnej od jonów Zn(II) regulacji struktury i funkcji całego kompleksu MRX w komórkach drożdży.

Doktorant wykazał, że wymiana jonów Zn(II) na Cd(II) w domenie haczyka cynkowego białka Rad50 z *P. furiosus* zachodzi szybko i wydajnie, również w obecności metalotionein - białek magazynujących i buforujących jony Zn(II) w komórkach o wysokim powinowactwie do jonów Cd(II), a kompleks zachowuje swoją stechiometrię ( $Zn(Hk)_2 + Cd(II) \rightleftharpoons Cd(Hk)_2 + Zn(II)$ ). W badaniach termodynamiki procesu wymiany udowodnił, że główną siłą napędową tego procesu jest korzystna zmiana entalpii kompleksowania jonów Cd(II), która jest aż o 2,6 kcal/mol niższa od entalpii kompleksowania Zn(II) (tworzenia wiązań Zn—S). Powstający kompleks Cd(Hk)<sub>2</sub> jest najbardziej stabilnym kompleksem jonu Cd(II) z cząsteczką biologiczną opisanym w literaturze, a jego struktura jest istotnie odmienna w porównaniu z kompleksem z jonem Zn(II), co Doktorant udokumentował analizą strukturalną jądrowego rezonansu magnetycznego. Wyniki uzyskane w toku pracy badawczej sugerują, że wymiana Zn(II)/Cd(II) w domenie haczyka cynkowego może zachodzić w warunkach komórkowych, co mogłoby skutkować upośledzeniem funkcji białka Rad50, a w efekcie osłabieniem mechanizmów naprawy pęknięć podwójnych DNA wywołując efekt genotoksyczny.

Pracę zamykają „Konkluzje”, które są bardzo szczegółowe i zajmują ponad 7 stron. Szkoda, że Autor nie przygotował bardziej syntetycznego podsumowania badań.

Pracę doktorską Pana mgr. Michała Padjaska przeczytałem z dużym zainteresowaniem. Pomimo wysokiej wartości rozprawy Doktorantowi podczas jej redakcji nie udało się ustrzec błędów czy usterek edycyjnych, ale są one nieliczne. Z obowiązku recenzenta poniżej wymieniam przykładowe z nich oraz moje krytyczne uwagi:

- Str. 73 – przy opisie struktury białka Rad50 jest błędnie wskazany nr ryciny. Jest podana rycina 12, która przedstawia wyniki rozdziału SDS-PAGE.
- Str. 81 – „orgnizmów” zamiast organizmów,
- Str. 142 – „że jej struktura nie jest ona analogiczna do struktury domeny z białka ludzkiego” – nie powinno być wyrazu „ona”;
- Str. 9 – „umożliwia łączenie dwóch pękniętych cząsteczek DNA ze sobą na przestrzeni nawet 1200 Å” – odległość możemy mierzyć w Å a nie przestrzeń.

- Str. 47 – „Jako fazy stałej skorzystano ze złoża TentaGel R RAM Amide Rink o obsadzeniu rzędu 0,18 - 0,22 mmol/g” - powinno być: jako fazy stałej użyto złoża ...
- Str. 48 – „Uzyskane peptydy następnie oczyszczono z użyciem HPLC (Dionex Ultimate 3000) stosując kolumny Phenomenex PEPTIDE XBC18, używając gradientu 5 - 55% ACN w 0,1% TFA w H<sub>2</sub>O a zebrane frakcje liofilizowano.” - brak rozmiaru kolumny, czasu realizacji gradientu i szybkości przepływu fazy ruchomej.

Wymienione mankamenty nie umniejszają jednak wartości merytorycznej rozprawy, w której mgr Michał Padjasek zaprezentował bardzo interesujące i wartościowe wyniki.

Podsumowując, podjęta tematyka jest interesująca, aktualna. Projekt rozprawy jest przemyślany, cele jasno określone i przy dużym nakładzie pracy zrealizowane. Wnioskowanie jest dobrze poparte danymi eksperymentalnymi i odniesieniami do stanu wiedzy w literaturze. Na szczególne uznanie zasługuje biegłość w posługiwaniu się przez Doktoranta metodami syntezy i oczyszczania peptydów i białek oraz licznymi technikami służącymi do badania ich czystości, struktury oraz oddziaływania z jonami metali. Uzyskane i opisane w ramach niniejszej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły wiedzę na temat właściwości fizykochemicznych domeny haczyka cynkowego białek Rad50 z trzech organizmów: *H. sapiens*, *S. cerevisiae* oraz *P. furiosus* i mogą być wykorzystane w przyszłych pracach nad naprawą DNA.

Pan mgr Michał Padjasek jest współautorem 5 publikacji w czasopismach z bazy JCR. Należy zaakcentować, że w dwóch pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a trzy związane są z tematyką recenzowanej pracy oraz kierownikiem projektu z funduszy NCN pozyskanego w ramach programu Preludium.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz wnoszą do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pana mgr. Michała Padjaska do dalszych etapów przewodu doktorskiego i biorąc pod uwagę wartość wyników badań zawartych w recenzowanej pracy wnioskuję o wyróżnienie.

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej  
  
prof. dr hab. Wojciech Kamysz