

Prof. dr hab. Grażyna Stochel
Członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk
Kierownik Zespołu Fizykochemii Koordynacyjnej i Bionieorganicznej UJ



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 15 czerwca 2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Kluski

pt. „Impact of sequence diversity in zinc finger motifs on their coordination properties, structure and stability”

Wydział Chemii

(tytuł w języku polskim „*Wpływ zmienności sekwencyjnej w motywach palców cynkowych na ich właściwości koordynacyjne, strukturę oraz stabilność*”)

Uwagi ogólne

Pani mgr Katarzyna Kluska wykonała pracę doktorską na Wydziale Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej pod opieką pana profesora dr hab. Artura Krężela. Recenzowana praca wpisuje się w prowadzone w grupie profesora Krężela badania z zakresu chemii biologicznej, w szczególności w badania nad czynnikami wpływającymi na strukturę, stabilność oraz właściwości wybranych układów białkowych. Doktorantkę zainteresowały motywy palców cynkowych i czynniki mające potencjalny wpływ na ich strukturę, stabilność i właściwości fizykochemiczne a w konsekwencji na funkcjonalność białek zawierających te motywy. Cynk pomimo, że należy do grupy biopierwiastków śladowych jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania wielu organizmów, w tym również organizmu człowieka. Różnorodne funkcje biologiczne pełnią zarówno wolne jony cynku jak i połączenia cynku z różnymi biocząsteczkami, w szczególności z białkami. Wśród białek wiążących jony cynku niezwykle ważną rolę w utrzymaniu homeostazy jonów cynku pełnią białka należące do grupy tionein. Zaburzenie homeostazy cynku, tak jak i każdego innego biopierwiastka, może prowadzić do wielu nieprawidłowości i zaburzeń o charakterze patologicznym a w konsekwencji rozwoju różnych chorób. Dostępne dane

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.cnemia.ui.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

literaturowe na temat białek cynkowych a w szczególności struktury i właściwości fizykochemicznych motywów palców cynkowych są niewystarczające do pełnego poznania mechanizmów aktywacji i dezaktywacji tych domen determinujących określone funkcje białka.

Rezultaty dotychczasowej działalności badawczej Doktorantki pozwoliły na jej współautorstwo w pięciu opublikowanych artykułach naukowych. W czterech spośród tych artykułów doktorantka jest pierwszym autorem. Warto podkreślić, iż wszystkie prace ukazały się w bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu tj. *Coord. Chem. Rev.*, *Metallomics.*, *Chem. Commun.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* czy *J. Inorg. Biochem.* Wszystkie prace dotyczą zagadnień i badań przedstawionych w doktoracie.

Wydział Chemii

Ocena formalna pracy.

Z formalnego punktu oceniana rozprawa doktorska ma formę klasycznej rozprawy z podziałem na kilka części, w których kolejno przedstawione zostały: abstrakt w języku angielskim i streszczenie w języku polskim, wprowadzenie literaturowe i cel pracy, opis stosowanych metod i materiałów, uzyskane wyniki i ich dyskusja, podsumowanie i perspektywy dalszych badań, dane uzupełniające, bibliografia, lista publikacji własnych. Dodatkowo w pracy umieszczono wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń, spis treści oraz informację o finansowaniu badań przez Narodowe Centrum Nauki. Prace badawcze wykonywane były w ramach czterech projektów, w tym jednego przyznanego doktorantce (NCN, Preludium nr projektu 2019/33/N/ST00409) oraz trzech projektów kierowanych przez profesora Artura Krężela (Sonata Bis, grant nr 2012/07/E/NZ1/01894, Opus nr grantu 2016/21/B/NZ1/02847, Opus ST 2019/33/B/ST4/02428). Praca doktorska została napisana w języku angielskim, jest bogato ilustrowana wzorami strukturalnymi, wykresami i schematami reakcji. Na podkreślenie zasługuje duża dbałość o szczegóły w opisie przedstawianych wyników oraz wysoka jakość ich opracowania.

W rozpoczynającym rozprawę wprowadzeniu Autorka jasno formułuje cele pracy oraz uzasadnia wybór tematu badań. W części doświadczalnej przedstawia opis wszystkich badań przeprowadzonych w celu uzyskania

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



odpowiedzi na postawione zagadnienia włączając również te badania, które zostały wykonane przez innych współautorów publikacji, zaznaczając w toku pracy kto wykonał określone pomiary.

W ramach pracy doktorskiej Doktorantka postawiła sobie za cel nadrzędny zbadanie relacji pomiędzy sekwencją, strukturą a stabilnością motywów palców cynkowych. Aby osiągnąć zamierzony cel główny sformułowała trzy szczegółowe cele badawcze.

- po pierwsze, sprawdzenie wpływu zmian sekwencji (usunięcie lub podstawienie) w obrębie zmiennych pod względem sekwencji fragmentów klasycznych motywów palców cynkowych CCHH (skutkujących fałdowaniem $\beta\beta\alpha$) na zmiany w koordynacji jonów cynku, zmiany w strukturze oraz stabilności tych motywów;
- po drugie, poznanie wpływu jonów srebra na strukturę, geometrię oraz stabilność motywów palców cynkowych;
- a po trzecie, dokonanie charakterystyki fizykochemicznej i strukturalnej bogatej w reszty cysteinyłowe domeny pochodzącej z ludzkiego białka MTF1, będącego czynnikiem transkrypcyjnym posiadającym klasyczny motyw palca cynkowego typu CCHH.

Wprowadzenie liczy 28 stron ale biorąc pod uwagę jak bogato jest ilustrowany schematami reakcji i strukturami molekularnymi omawianych związków okazuje się bardzo dobrze przygotowanym, syntetycznym przewodnikiem w dostępnych informacjach literaturowych w tematyce doktoratu. Doktorantka systematycznie przedstawia materiał potrzebny do uzasadnienia wyboru tematu badań oraz omawia te zagadnienia z biochemii cynku, które bezpośrednio wiążą się z przeprowadzonymi przez nią badaniami. Kolejne rozdziały wstępu poświęcone zostały takim zagadnieniom jak: biologiczna i fizjologiczna rola jonów Zn^{2+} , w tym regulacja homeostazy cynku u ssaków i znaczenie białka MTF1 w tej homeostazie, charakterystyka miejsc wiążących Zn^{2+} w białkach, charakterystyka białek zwanych palcami cynkowymi, w tym struktury i stabilności klasycznych motywów palców cynkowych CCHH (fałdowanie $\beta\beta\alpha$), problem wiązania jonów srebra i ich toksyczności.

Ta część pracy jest przygotowana starannie i stanowi dobre wprowadzenie do kolejnych rozdziałów poświęconych omówieniu celu pracy oraz części

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Chemii

doświadczalnej. Następnie doktorantka zwięźle opisuje cel główny i cele szczegółowe pracy i przechodzi do omówienia stosowanych materiałów i metod badawczych. Poddaje krytycznej ocenie porównawczej przydatność poszczególnych metod do rozwiązywania postawionych problemów badawczych. Wśród stosowanych metod znalazły się metody badawcze wykorzystywane w biologii komórki czy biotechnologii oraz typowe dla badań chemicznych czy biochemicznych. Najpierw podaje podstawowe informacje o stosowanych metodach (spektrofotometria UV-Vis, rentgenowska spektroskopia absorpcyjna XAS, spektroskopia dichroizmu kołowego CD, metody spektrometrii mas (IM-MS, LC-MS, ESI-MS/MS), metody chromatograficzne, metoda izotermiczna kalorymetria miareczkowa ITC, a następnie bardziej szczegółowo opisuje syntezę i oczyszczanie badanych peptydów, ekspresję w systemie bakteryjnym i oczyszczanie badanych białek, przygotowywanie roztworów, oznaczanie stężeń peptydów i białek, miareczkowanie spektrofotometryczne, pomiary spektropolarymetryczne, pomiary metodami kompetencyjnymi.

Rezultaty badań Doktorantka przedstawiła na 46 stronach rozdziału 4 z podziałem na pięć podrozdziałów poświęconych kolejno następującym zagadnieniom: termodynamiczna i strukturalna charakterystyka klasycznych motywów palców cynkowych ZF zawierającym omówienie wyników badań nad wiązaniem jonów metali (Zn, Co) do modelowych peptydów bazujących na sekwencji Cp1-1991 i Cp1-2015 (4.1.1 i 4.1.2) oraz badaniu wiązania jonów Zn^{2+} do naturalnie występujących zmienionych motywów klasycznych palców cynkowych poprzedzone opisem wyników bioinformatycznej analizy klasycznych motywów palców cynkowych zdeponowanych w bazie danych UNIPROT (4.2.1), zawierających kolejno opis wyników badań nad kwasowo-zasadowymi właściwościami zmienionych naturalnych motywów ZF i zmianami w zakresie koordynacji i struktury związanymi z wiązaniem jonów Zn^{2+} do zmienionych ZF jak i powinowactwa jonów cynku do tych zmienionych miejsc koordynacyjnych w kontekście biologicznych funkcjonalności (4.2.2-4.2.6); badania wiązania jonów srebra Ag^+ do sekwencyjnie różnych motywów palców cynkowych (4.3) oraz badania motywów bogatych w reszty cysteinyłowe otrzymanych z ludzkiego czynnika

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



transkrypcyjnego MTF1 pod kątem ich powinowactwa do wiązania jonów cynku oraz mechanizmów kontrolowanej przez stężenia wolnego cynku regulacji biosyntezy białek cynkowych.

Następny, piąty rozdział poświęcony jest dyskusji wyników prezentowanych w pracy doktorskiej na tle dostępnych danych literaturowych. Kolejny rozdział zawiera wnioski końcowe i perspektywy dalszych badań w tematyce pracy doktorskiej. Informacje na temat odnośników literaturowych, publikacji współautorstwa doktorantki, źródeł finansowania zamykają rozprawę doktorską.

Wydział Chemii

Ocena merytoryczna pracy.

Pierwsza i druga część badań dotyczy charakterystyki czynników strukturalnych i termodynamicznych przyczyniających się do utraty stabilności klasycznych motywów palców cynkowych CCHH ($\beta\beta\alpha$). Badania przeprowadzono początkowo na dwóch modelowych peptydach opartych na sekwencji konsensowej palców cynkowych pierwotnie zdefiniowanej w roku 1991 (Cp1-1991) i tej doprecyzowanej w 2015 roku (Cp1-2015). Następnym krokiem były badania na naturalnie zmienionych sekwencjach klasycznych motywów cynkowych wykazujących nietypowe, zmienione wykazujące obecność jedynie trzech donorów miejsce koordynacji cynku. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pokazały, że modelowe peptydy typu Cp1-1991 i Cp1-2015 różnią się istotnie stabilnością tworzonych kompleksów cynkowych pomimo zachowanej w dużym stopniu sekwencji. Wśród czynników powodujących spadek stabilności wskazano na utratę wiązań wodorowych pomiędzy zmiennymi resztami aminokwasowymi pochodzącymi z fragmentu α -helisy a nieulegającymi zmianom hydrofobowymi resztami aminokwasowymi w kieszeni wiążącej jony cynku a także zaburzenia w innego typu oddziaływaniach. Przeprowadzona analiza termodynamiczna wiązania jonów cynku do motywów palców cynkowych zmiennych sekwencyjnie wykazała, że tworzenie silnych kompleksów z Zn^{2+} wynika z korzystnej zmiany czynnika entalpowego, ale w peptydach o obniżonej stabilności konkretne zmienne aminokwasy są zaangażowane w wiązania wodorowe a ich utrata obniża stabilność termodynamiczną i istotny staje się

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

czynnik entropowy związany z reorganizacją strukturalną, zmianami w solwatacji i interakcjach wewnątrzcząsteczkowych.

Z kolei badania na naturalnie występujących zmienionych motywach palców cynkowych zawierających tylko trzy donory w kieszeni wiążącej jony cynku pokazały że te naturalne zmiany w obrębie klasycznych motywów palców cynkowych mają wpływ na strukturę, stabilność oraz funkcje biologiczne ZF. Badania spektroskopowe wykazały, że w zależności od zmienianej pozycji powstałe motywy ZF zawierające tylko trzy aminokwasowe miejsca donorowe mogą dodatkowo koordynować jedną lub dwie cząsteczki wody. Uzyskane wyniki pomiarów stabilności motywów palców cynkowych z zaburzoną sferą koordynacyjną wykazały, że w przypadku braku jednej reszty cysteinyłowej powinowactwo do jonów cynku zostało zmniejszone o około 4-5 rzędów wielkości w porównaniu do motywów klasycznych palców cynkowych dzikiego typu. Pokazano również, że wyliczone stałe dysocjacji dla grupy palców cynkowych zawierających substytucję w obrębie reszt histydyłowych pokrywają się z zakresem fluktuacji stężenia wolnych jonów cynku w komórce. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki sugerują regulatorową rolę motywów palców cynkowych z zaburzona sferą koordynacyjną.

Wpływ na strukturę, stabilność i właściwości motywów palców cynkowych ma również zmiana jonu metalu w centrum koordynacji. Dlatego w następnym etapie Doktorantka zajęła się sprawdzeniem wpływu koordynacji jonów srebra do zsyntetyzowanych zmiennych sekwencyjnie peptydów opartych na sekwencji motywu palca cynkowego Cp1-2015. Wybór jonów srebra podyktowany został gwałtownie wzrastającą dostępnością tych jonów w środowisku. Duże ilości srebra są wprowadzane do obiegu środowiskowego poprzez coraz częstsze, niesprawdzone pod względem zagrożenia toksycznymi skutkami dla organizmu człowieka wykorzystywanie nanocząstek srebra jako przeciwdrobnoustrojowych dodatków do kosmetyków, środków czystości, różnego rodzaju opakowań i innych materiałów ogólnej użyteczności. Uzyskane przez doktorantkę wyniki wyraźnie wskazują, iż jony srebra wydajnie wiążą się do motywów palców cynkowych zawierających reszty cysteinyłowe w sposób liniowy

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

tworząc wysoce stabilne kompleksy Ag_nS_n . Zastąpienie jonów cynku jonami srebra skutkuje dramatyczną zmianą geometrii koordynacyjnej i struktury motywów palców cynkowych powodując również zmiany strukturalne i funkcjonalne białek cynkowych. Badania te wnoszą istotne informacje na temat molekularnych podstaw toksyczności jonów srebra i ich źródła jakim są całkowicie beztrosko coraz częściej stosowane nanocząstki srebra.

Ostatnim problemem badawczym, którym zajęła się doktorantka była charakterystyka fizykochemiczna i strukturalna bogatych w reszty cysteinyłowe C-końcowych fragmentów zależnego od jonów cynku czynnika transkrypcji MTF1. Ten czynnik transkrypcji jest zaangażowany w metalozależną biosyntezę wielu białek cynkowych mających wpływ na homeostazę Zn^{2+} w komórce. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki dowodzą, że ten wysoce zachowany u wyższych eukariontów motyw jest zdolny do wiązania Zn^{2+} ze stałą dysocjacji odpowiadającą zakresowi stężeń charakterystycznych dla wolnych jonów cynku w komórce. Dodatkowo wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę pokazały, że ten bogaty w reszty cysteinyłowe motyw palca cynkowego wiążąc jony cynku może w zależności od stężenia wolnych jonów Zn^{2+} tworzyć monomery lub dimery. Przyjmując możliwość oddziaływania formy dimerycznej z cząsteczkami DNA Doktorantka wskazała prawdopodobny mechanizm regulacji/kontroli ekspresji białek cynkowych poprzez zależną od dostępności wolnych jonów cynku równowagę monomeryczny - dimeryczny kompleks cynkowy badanego bogatego w reszty cysteinyłowe fragmentu czynnika transkrypcyjnego MTF1.

Podsumowanie

Podsumowując stwierdzam, że zarówno cel ogólny jak i zaproponowane przez Doktorantkę szczegółowe cele pracy zostały osiągnięte. Rezultaty badań Doktorantki wnoszą nowe znaczące przyczynki do poznania biochemii cynku, w szczególności dotyczące zależności sekwencja-struktura-stabilność-funkcje dla motywów palców cynkowych i białek cynkowych.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej pracy doktorskiej należy:

- wykazanie istnienia motywów palców cynkowych z naturalnie zmienionymi miejscami wiązania jonów cynku, w których występują tylko trzy ligandy pochodzące z białka a czwarte (a czasami również piąte) wolne miejsce koordynacji zajmuje cząsteczka wody,

- wykazanie, że zmieniając reszty aminokwasowe w zakresie niestabilizowanej sekwencji motywów palców cynkowych można wpływać na termodynamiczną stabilność tych motywów z zachowaniem funkcjonalnego fałdowania $\beta\beta$ co w przyszłości może być wykorzystane w inżynierii białkowej

- wykazanie istotnych zmian strukturalnych motywów palców cynkowych po związaniu jonów srebra jako istotnego mechanizmu molekularnego mogącego tłumaczyć genotoksyczność tych jonów i wskazując na konieczność rozszerzenia tych badań w kierunku innych białek zawierających grupy tiolowe

Zwłaszcza w kontekście coraz większej dostępności nanocząstek srebra w środowisku.

- wykazanie zależnej od stężenia jonów cynku dimeryzacji bogatego w reszty cysteinyłowe fragmentu białka MTF1 jako nowego molekularnego mechanizmu kontroli/regulacji Zn^{2+} przez czynnik transkrypcyjny MTF1.

Drobne potknięcia jak na przykład niefortunne sformułowania, czy też drobne błędy gramatyczne, literaturowe czy stylistyczne nie umniejszają mojej bardzo dobrej oceny przedstawionych osiągnięć naukowych Pani mgr Katarzyny Kluski. Mam jedną uwagę formalną. Otóż ze względu na przyjęty przez Doktorantkę sposób przedstawienia wyników badań związanych z tematyką pracy a uwzględniający w pewnym stopniu również badania przeprowadzone przez innych współautorów końcowych publikacji ocena pracy wykonanej przez samą Doktorantkę był utrudniony chociaż nie niemożliwy. Mam również pytanie i prośbę do Doktorantki aby w czasie obrony przybliżyła nam sugerowane obecnie w literaturze mechanizmy toksycznego działania nanocząstek zwłaszcza nanocząstek metali, ponieważ zabrakło mi takiego rozdziału w pracy.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników, poprawnie sformułowane wnioski. Wszystkie schematy, tabele i rysunki zostały wykonane z ogromną starannością. Postawione cele pracy zostały zrealizowane a otrzymane przez Autorkę wyniki badań poszerzają naszą wiedzę z zakresu chemii koordynacyjnej i chemii biologicznej cynku wnosząc cenne informacje w zakresie wpływu zmienności sekwencyjnej w motywach palców cynkowych na ich właściwości koordynacyjne, strukturę i stabilność oraz w zakresie badań nad toksycznością i cytotoxycznością nanocząstek srebra. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zawarte w art. 186 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) oraz uchwale nr 131/2019 Senatu Uniwersytetu Wrocławskiego. W związku z tym, z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Kluski do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy i jej wyjątkowo staranne opracowanie oraz fakt, iż otrzymane wyniki zostały już opublikowane w pięciu artykułach w prestiżowych czasopismach wnoszę o jej wyróżnienie.

Wydział Chemii

ul. Gronostajowa 2

30-387 Kraków

tel. +48 12 686 26 00

fax +48 12 686 27 50

sekretar@chemia.uj.edu.pl

www.chemia.uj.edu.pl