

Prof. dr hab.
Sylwia Rodziewicz-Motowidło
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 30.06.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Kluski

pt.: „Wpływ zmienności sekwencyjnej w motywach palców cynkowych na ich właściwości koordynacyjne, strukturę oraz stabilność” wykonanej w Zakładzie Chemii Biologicznej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Artura Krężela

Motyw palca cynkowego to odmiana domeny białkowej występującej w białkach. Bierze ona bezpośredni udział w oddziaływaniu z cząsteczką kwasu DNA. Obecność jonu cynku Zn^{2+} jest kluczowa dla stabilności domeny i prawidłowej budowy. Palec cynkowy składa się z dwóch antyrównoległych β -katek i α -helisy (struktura $\beta\beta\alpha$ stabilizowaną przez jon Zn^{2+}). Struktura każdej domeny jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie. Pojęcie palca cynkowego pierwotnie został użyty do opisanie podobnej do palca hipotetycznej struktury pochodzącej z czynnika transkrypcyjnego IIIA (TFIIIA) żaby szponiastej. W rzeczywistości motyw palca cynkowego można przyrównać do budowy ręki człowieka gdzie dłoń to rusztowanie dwóch β -katek a zwinięte palce to α -helisa. Wystający kciuk to wypętlenie łańcucha polipeptydowego, pomiędzy dwoma β -nićmi, o różnej długości, który stał się podstawą do nazwania białkowego motywu strukturalnego „palcem cynkowym”. W biologii strukturalnej to z resztą nie jedyny motyw strukturalny przyrównany do ręki człowieka. Należy do nich również motyw dłoni EF, w którym ustawienie helis E i F wygląda tak jak palec wskazujący i kciuk prawej ręki. Obydwa motywy strukturalne są odpowiedzialne za wiązanie jonów metali. Przestrzenne, charakterystyczne ułożenie α -helis w motywie helix-loop-helix oddziałującym z kwasem DNA jest również przyrównywany do ułożenia kciuka i palca wskazującego w dłoni człowieka. Motyw ręki i palców znalazł swoje zastosowanie nie tylko w biologii strukturalnej ale także w literaturze (np. „Palcem w bucie” Jana Brzechwy, „Malec-Palec” braci Grimm itd.), sztuce (np. „Stworzenie Adama” Michała Anioła w kaplicy Sykstyńskiej), filmie (np. „The Hand of God” w reżyserii Paolo Sorrentino) czy w codziennych powiedzeniach (np. sam jak palec – samotny; palec boży – los; mieć w małym palcu – znać się, owijać wokół palca - podporządkowywać). Szczególnie dla sztuki średniowiecza bardzo charakterystyczny był tzw. motyw manus Dei, czyli ręki Boga - symbol boskiej interwencji w ludzkie sprawy. Nieco podobny do motywu ręki Boga, w swojej symbolice, jest motyw ręki z palcem cynkowym, który wiążąc się do kwasu DNA warunkuje interwencję w ludzkie sprawy czyli kontrolę nad materiałem genetycznym człowieka. Aby poznać naturę owej boskiej interwencji niezbędne są wszechstronne badania fizykochemiczne i biologiczne w których nurt wpisuje się praca doktorska pani mgr inż. Katarzyny Kluski.

Rozprawa doktorska została wykonana pod opieką prof. dr hab. Artura Krężela na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Całość rozprawy obejmuje 157 stron maszynopisu i podzielona jest na osiem głównych rozdziałów (tj. wstęp literaturowy, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusje, podsumowanie, załączniki i literaturę). Rozdziały te poprzedza streszczenie oraz bardzo przydatny wykaz używanych skrótów. Spis piśmiennictwa obejmuje 262 pozycje (14 stron) a około 8% z nich to odniesienia do publikacji współautorstwa

promotora Doktorantki. W pracy umieszczono kilka tabel, kilkanaście kolorowych rysunków i widm, które znacznie ułatwiły zrozumienie przedstawionych wyników. Praca ma układ typowy dla prac z zakresu nauk ścisłych i przyrodniczych. Napisana jest w języku angielskim, w sposób poprawny i przystępny. Na szczególną pochwałę zasługują wyjątkowo estetyczne i bardzo profesjonalne rysunki, których rozdzielczość jest wyjątkowo wysoka a kolorystyka ma odpowiednie znaczenie. Te elementy edytorskie sprawiły, że pracę przeczytałam z dużym zrozumieniem i z wielką przyjemnością. W pracy znalazłam nieliczne błędy edycyjne które w żaden sposób nie wpływają na moja wysoką ocenę recenzowanej pracy doktorskiej (np. brak oznaczeń C-E w podpisie rysunku 4, str. 28; na rysunku 13 jeden atom azotu powinien być siarką (CCHC) oraz schematycznie zaznaczone wiązania mają różne długości; widma CD mogły by mieć jednakową skalę eliptyczności molowej dla porównywanych widm; słowo „geotaxis” zamiast „genotoxicity” na stronie 134). Szczególną uwagę zwracają długie podziękowania, skierowane do promotora, współpracowników, przyjaciół i rodziny. Ich treść wskazuje, że Doktorantka potrafi współpracować z wieloma osobami z różnych części świata, nie zapominając przy tym o swoich korzeniach rodzinnych.

Mgr inż. Katarzyna Kluska na początku swojej pracy przedstawiła w sposób możliwie syntetyczny, informacje na temat biologicznej i fizjologicznej roli jonów cynku Zn^{2+} u ssaków, budowy miejsc koordynujących, białek zawierających motywy palców cynkowych oraz na temat toksyczności jonów Ag^+ . Ze szczególnym zainteresowaniem, jako potencjalny użytkownik suplementów diety, przeczytałam fragment o niewłaściwych procesach fizjologicznych zachodzących pod wpływem zmniejszonego lub zwiększonego stężenia jonów Zn^{2+} u ssaków. Natomiast jako potencjalnego użytkownika nanomateriałów zaniepokoiły mnie informacje na temat negatywnego wpływu jonów Ag^+ na organizmy żywe. Ilość informacji, przedstawiona jedynie na 26 stronach i obejmująca 176 odnośników literaturowych, jest doprawdy imponująca! Bardzo pozytywnie oceniam również strukturę wstępu, w którym w kolejnych podrozdziałach następuje coraz większa złożoność opisywanych treści. Wstęp pracy doktorskiej mgr inż. Kluski to doskonałe kompendium wiedzy na temat roli jonów Zn^{2+} w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu oraz na temat budowy i funkcji biologicznych białek posiadających motyw palców cynkowych. Po lekturze tej części pracy doktorskiej nasunęły mi się następujące pytania: (i) jaka jest rola jonów Zn^{2+} w regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu żywego? (ii) czy można powiedzieć, że podwójne palce cynkowe (np. HIT), przedstawione na rysunku 5 (str. 30) tworzą wyższego rzędu motyw strukturalny klucza greckiego? (iii) o jakich wiązaniach wodorowych mowa w zdaniu (7 wiersz od dołu) na stronie 32? (iv) Czy Doktorantka mogłaby na podstawie uzyskanej w ostatnich latach wiedzy, na temat budowy palców cynkowych, zaproponować wymogi strukturalne i sekwencyjne „sztucznego” białka z motywem palca cynkowego, które niczym wspomniana manus Dei, mogłoby wyjątkowo selektywnie włączyć lub wyłączyć określony gen (pytanie nawiązuje do ostatniego zdania na stronie 33)? (v) Czy, wobec danych na temat toksycznego działania nanocząstek srebra, należałoby odchodzić od ich stosowania w przemyśle i medycynie? Czy istnieje ryzyko, że niczym historia o „radowych dziewczynach”, sytuacja się powtórzy?

Lektura wstępu teoretycznego pracy doktorskiej mgr inż. Kluski wskazała, że informacje na temat fizykochemicznej charakterystyki palców cynkowych koordynujących jony Zn^{2+} lub Ag^+ oraz białek ze strukturalnymi miejscami wiązania cynku są niewystarczające do pełnego poznania mechanizmu stabilizacji tych białek a tym samym ich roli fizjologicznej. Dlatego, postanowiła uzupełnić braki wiedzy w tym zakresie, wykonując szereg badań w ramach swojej pracy doktorskiej. Pani Kluska postawiła sobie kilka celów badawczych do których należały: **(i) zbadanie zależności pomiędzy sekwencją, strukturą a stabilnością w palcach cynkowych; (ii) poznanie wpływu jonów Ag^+ na strukturę, geometrię oraz stabilność zmiennych sekwencyjnie palców cynkowych oraz (iii)**

charakterystyka fizykochemiczna i strukturalna domeny pochodzącej z ludzkiego białka MTF1, posiadająca motyw palca cynkowego CCHH.

Kolejny rozdział pracy, zatytułowany „Materiały i metody”, został przez Doktorantkę podzielony na 18(!) części (23 strony), które oddają różnorodność technik badawczych zastosowanych w recenzowanej dysertacji. Pani mgr inż. Kluska użyła w mojej opinii właściwych metod i procedur wymaganych przy badaniach oddziaływań jonów metali z peptydami/białkami do których należały, w dużym uproszczeniu: (i) synteza peptydów na nośniku stałym, (ii) nadprodukcja białek w systemie bakteryjnym, (iii) metody spektroskopowe: UV-VIS, CD, XAS, (iv) metody spektrometrii mas, (v) techniki chromatograficzne: SEC i HPLC oraz (vi) metody kalorymetryczne: ITC. Wszystkie czynności zostały dokładnie opisane i na pewno będą służyły młodszym koleżankom i kolegom jako źródło „gotowych procedur” w ich badaniach. Zabrakło jedynie pełnych informacji na temat ilości trajektorii podczas obliczeń MD oraz struktur startowych i pH w jakim prowadzone były obliczenia, co może mieć znaczenie w przypadku stanu sprotonowania reszt histynylowych (str. 49) . Nie znalazłam również informacji na temat krzywej kalibracyjnej dla pomiarów SEC (str. 70)? Jaki standard był zastosowany w analizie SEC? Oprócz informacji technicznych o wykonanych eksperymentach w tej części pracy wyjaśnione zostały podstawy teoretyczne zastosowanych technik badawczych, co gwarantuje prawidłowe rozumienie stosowanych przez Doktorantkę technik eksperymentalnych.

Następny główny rozdział rozprawy doktorskiej zatytułowany został „Wyniki” i został podzielony przez Doktorantkę na cztery zasadnicze części tj.: (i) charakterystyka termodynamiczna i strukturalna klasycznych motywów palców cynkowych; (ii) badanie wiązania jonów Zn^{2+} do naturalnie występujących palców cynkowych; (iii) wiązanie jonów Ag^+ do różnych palców cynkowych i zbadanie wpływu tych jonów na strukturę palców cynkowych oraz; (iv) właściwości wiązania jonów Zn^{2+} do motywu bogatego w cysteiny pochodzącego z ludzkiego białka MTF1. W pierwszym podrozdziale mgr inż. Kluska wybrała dwa modele peptydowe palców cynkowych tj. Cp1-1991 oraz Cp1-2015. Sekwencja aminokwasowa obu peptydów różni się nieznacznie ale za to ich stabilność jest wyraźnie różna. Dlatego Doktorantka postanowiła zastąpić pojedyncze lub potrójne reszty aminokwasowe w peptydzie Cp1, resztami występującymi w peptydzie Cp1-2015. Przeprowadziła badania strukturalne CD dla dziesięciu, wcześniej zsyntetyzowanych peptydów, które zmieniały swoją strukturę pod wpływem koordynacji jonów Zn^{2+} ale nie wskazały wyraźnych różnic w strukturze drugorzędowej między sobą. Następnie, na podstawie badań potencjometrycznych z jonami Co^{2+} i wyznaczonych izoterm wiązania jonów Zn^{2+} obliczyła wartości stałej dysocjacji oraz parametry termodynamiczne. Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowała, że wiązanie jonów Zn^{2+} do badanych peptydów jest bardzo silne i wynika ono z korzystnej zmiany czynnika entropowego. Na podstawie analizy strukturalnej palców cynkowych uzyskanych po MD zauważyła, że w peptydach o obniżonej stabilności, określone/zmienione reszty aminokwasowe nie tworzą wiązań wodorowych stabilizujących oddziaływań pomiędzy α -helisą a β -karką, co wpływa na obniżenie ich stabilności termodynamicznej. Do tej części pracy mam dwa pytania: (i) pierwsze dotyczy wprowadzonych zmian do sekwencji peptydu Cp1-1991. Ponieważ w pracy przedstawione są struktury przestrzenne palców cynkowych w reprezentacji wstęgowej (rysunek 27) to nie widać czy w badanych strukturach tworzą się mostki solne pomiędzy przeciwnie naładowanymi resztami. Czy obecność lub brak takich aminokwasów mogła wpłynąć na obniżoną stabilność? (ii) jakiej technik eksperymentalnej można by użyć w celu wyznaczenia dokładnej struktury przestrzennej badanych palców cynkowych.

W podrozdziale (ii) mgr inż. Kluska opisała swoje prace nad analizą sekwencji motywów palców cynkowych zdeponowanych w bazie UniProt w białkach będących ludzkimi lub mysimi czynnikami transkrypcyjnymi. Zauważyła, że ok 10% z nich zawiera naturalne mutacje, zaburzające sferę koordynacyjną cynku. Postanowiła sprawdzić jak te mutacje wpływają na stabilność termodynamiczną i konformacyjną dla dziewięciu z nich. W tym celu, podobnie jak wcześniej zsyntetyzowała i oczyściła peptydy o odpowiedniej sekwencji zgodnej z UniProt. Przeprowadziła dla nich podobne badania fizykochemiczne jak dla wcześniejszej grupy peptydów. Jedynie zamiast wyznaczania izoterm wykonała testy konkurencyjności koordynacji jonów Zn^{2+} z metalotioneiną i palcami cynkowymi. Uzyskane wyniki pokazały, że w przypadku tych drugich pozbawienie jednej reszty cysteinyłowej zmniejsza stabilność struktury o ok. 4 do 5 rzędów wielkości w porównaniu do palców cynkowych z pełnym zestawem reszt koordynujących jony Zn^{2+} . Dodatkowo wyniki tych badań pokazały, że „niepełne” motywy palców cynkowych, pozbawione reszty Cys, tworzą kompleksy ZnL i koordynują, jako czwarte lub piąte miejsce koordynacyjne, cząsteczkę/ki wody. Dla palców cynkowych posiadających mutację w miejscu reszty histydynylowej tworzą się kompleksy typu ZnL_2 i ZnL . Podobnie kompleksy ZnL koordynują jako czwarte miejsce koordynacyjne cząsteczkę wody. Wyniki badań transferu jonów Zn^{2+} pomiędzy palcami cynkowymi a metalotioneiną pokazały natomiast, że w zależności od sekwencji aminokwasowej w motywie palców cynkowych, sfery koordynacyjne mogły być wysyczone lub niewysyczone w obecności białka. Oznacza to, że występowanie „niepełnych” motywów palców cynkowych w czynnikach transkrypcyjnych może mieć znaczenie regulatorowe w funkcjonowaniu organizmów. Czy rzeczywiście takowe posiada? Czy wiadomo z doniesień literaturowych jak *in vivo* działają czynniki transkrypcyjne z badanymi przez mgr inż. Kluskę palcami cynkowymi? Warto na koniec podkreślić, że tego typu struktury w których tylko trzy miejsca koordynacyjne w placach cynkowych pochodzą z białka a pozostałe są zapełnione przez cząsteczki wody nie zostały dotychczas odkryte a ich istnienie opisała mgr inż. Katarzyna Kluska.

W kolejnej części dysertacji Doktorantka zbadała wpływ jonów Ag^+ na strukturę i wiązanie się do palców cynkowych. Na początku, podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach zsyntetyzowała pięć różnych wersji peptydu Cp1-2015 w którym dokonała substytucji niektórych reszt aminokwasowych przez inne reszty koordynujące lub niekoordynujące jony metali. Tutaj nasuwa się pytanie dlaczego do badań wybrana została alanina a nie inny aminokwas? W swoich pracach p. Kluska wykorzystwała oprócz wcześniej wymienionych technik również spektroskopię XAS, spektrometrię mas oraz przeniesienia jonów Ag^+ do jonów CN^- . W tej części pracy opisała również eksperyment wykonany przez naukowców z Węgier a który polegał na badaniu zmian geometrii wiązania metalu oraz zmian konformacyjnych białka 1MEY# (Doktorantka samodzielnie otrzymała białko), posiadającego trzy wysyczone jonami Zn^{2+} domeny palców cynkowych i będącego w kompleksie z DNA podczas miareczkowania jonami srebra Ag^+ w obecności PAR. Przeprowadzone eksperymenty pokazały, że jony Ag^+ tworzą stabilne i silne kompleksy z palcami cynkowymi i dodatkowo wypierają jony Zn^{2+} zmieniając je w palce srebrne. Nowoutworzone struktury przestrzenne są znacznie zmienione w stosunku do charakterystycznej struktury motywu palca cynkowego, co najprawdopodobniej wpływa na genotoksyczność jonów Ag^+ . Wyniki badań opisanych w tej części badań są w mojej opinii najbardziej interesujące w całej rozprawie. Zastosowane zostały również ciekawe rozwiązania techniczne które symulują układ występujący w komórce. Wyniki tych badań zostały opublikowane w jednym z najlepszych czasopism chemicznych *Angew. Chem. Int. Ed.* (IF 15,34) oraz w *Chem. Comm. (Camb.)* (IF 6,22) a Doktorantka jest w nich pierwszym autorem.

W ostatnim podrozdziale mgr inż. Kluska zbadała wiązanie się jonów Zn^{2+} do motywu bogatego w cysteiny pochodzącego z ludzkiego białka MTF1. Białko to pośrednio uczestniczy w regulacji stężenia jonów cynku w komórce i posiada na C-końcu unikalny motyw bogaty w reszty Cys, zwany klastrem cysteinowym. Z uwagi na to, że motyw

ten jest wysoce konserwowany u wyższych eukariontów oraz, że nie istnieją doniesienia literaturowe na temat struktury i roli klastra cysteinowego, dlatego też problem ten postanowiła zbadać mgr inż. Kluska. Na początku, podobnie jak w poprzednich pracach zsyntetyzowała i oczyściła 7 peptydów. Wśród nich był krótszy i dłuższy C-końcowy fragment białka MTF1 oraz jego analogi alaninowe. Do badań wykorzystywała wcześniej używane techniki eksperymentalne. Doktorantka pokazała, że motyw klastra cysteinowego zdolny jest do wiązania jonów Zn^{2+} z powinowactwem zbliżonym do motywów palców cynkowych. Doktorantka pokazała również, że klastr cysteinowy podczas koordynacji Zn^{2+} tworzy dimer (z centrum dwujądrowym), którego obecność jest ściśle związana z dostępnością wolnych jonów Zn^{2+} w układzie. Ciekawe jest czy homodimeryzacji, według tego samego mechanizmu, może ulegać również pełnej długości białko MTF1? Przeprowadzone badania sugerują, że klastr cysteinowy może brać udział w aktywacji ludzkiego białka MTF1 i jego translokacji do jądra komórkowego, czy planowane są badania biologiczne weryfikujące tą hipotezę?

Lektura kolejnego rozdziału pt. „Dyskusje” wskazała na bardzo dużą dojrzałość naukową mgr inż. Katarzyny Kluski. W kolejnych podrozdziałach przedstawiła wyniki swoich badań w odniesieniu do danych literaturowych lub do wyników strukturalnych z MD uzyskanych przez zespół prof. Krężela. Badania MD są (tak wywnioskowałam) tematem pracy doktorskiej pana Manuela Peris-Diaz’a ale zostały uwzględnione w pracy doktorskiej mgr inż. Kluski do przeprowadzenia szczegółowej dyskusji wyników. Może warto by, na podstawie uzyskanych struktur MD palców cynkowych wygenerować teoretyczne widma CD i porównać je z tymi otrzymanymi przed mgr inż. Kluskę? Pozwoliłoby to na jeszcze lepsze zrozumienie zależności strukturalnych układów badanych przez mgr. inż. Kluskę. Całość rozprawy kończy rozdział zatytułowany „Wnioski i perspektywy na przyszłość” w którym Doktorantka kreśli możliwości wykonania nowych eksperymentów, które umożliwiłyby odpowiedź na wiele nowopowstałych pytań. Prac doktorska p. Kluski tylko potwierdziła, że motyw ręki i palców to wciąż niewyczerpany temat obejmujący różne dziedziny nauki i sztuki.

Reasumując, uważam, że tematyka recenzowanej pracy doktorskiej jest bardzo interesująca, część doświadczalna pracy doktorskiej została doskonale zaplanowana, wyniki zinterpretowane poprawnie a cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Rozprawa mgr inż. Katarzyny Kluski zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał doświadczalny. Czytając rozprawę można zauważyć ogrom pracy Doktorantki jaką włożyła w realizację poszczególnych zadań oraz w interpretację i dyskusję wyników. Należy również zwrócić uwagę na ilość zastosowanych przez Doktorantkę różniących się od siebie technik i procedur badawczych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz. 455). W tym odniesieniu wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Kluski do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ponadto, mając na względzie wkład pracy Doktorantki w uzyskanie nowych w skali światowej wyników badań, dotyczących właściwości fizykochemicznych i koordynacyjnych motywów palców srebrnych oraz cynkowych z trzema, białkowymi miejscami koordynacji a także badań klatek cysteinowych ludzkiego białka MTF1 oraz ich pełnej charakterystyki strukturalnej, zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy.

Sybilie Podienicz-Hustonielska