



prof. dr hab. Grzegorz Dubin

ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków

Telefon: (+48) 664-143-130

e-mail: grzegorz.dubin@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Michała Padjaska, pt. „Wpływ dynamiki koordynacyjnej Zn(II) na strukturę domeny haczykowej białka Rad50”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmuje badania nad dynamiką strukturalną domeny haczyka cynkowego białka Rad50. Białko Rad50 stanowi rdzeń strukturalny kompleksu MRN/X odpowiedzialnego za naprawę podwójnych pęknięć nici DNA, a więc za utrzymanie informacji genetycznej w stanie nienaruszonym. Tym samym, tematyka pracy dotyczy jednego z podstawowych zagadnień biologii co czyni przedstawione w pracy obserwacje niezwykle interesującymi.

Praca została przygotowana w Zakładzie Chemii Biologicznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Artura Krężela.

Pierwsze słowa zdania otwierającego streszczenie rozprawy nasunęły mi daleko idącą refleksję w świetle równoległej, niezwykle interesującej lektury książki „Sapiens” Yuvala Noah Harari. Autor rozprawy pisze: „Życie to kontinuum samopodtrzymującej się informacji -”. Czy w takim razie, gdy skonstruujemy samopowielające się maszyny, stworzymy nowe życie? Właściwie już w tej chwili istnieją skomplikowane układy maszyn wydobywających surowce, wytwarzających komponenty i butujących kolejne maszyny, a fakt iż w całym procesie potrzebna jest kontrola człowieka wydaje się właściwie wtórny. Istnieją już podstawy do stworzenia algorytmów które mogłyby kontrolować te procesy w sposób autonomiczny, i zapewne jest to tylko kwestią czasu. Poza tym, czy mykoplazmy która do powielania swojego materiału genetycznego potrzebuje wsparcia żywiciela (człowieka) nie traktujemy jako organizmu żywego? Ponadto, pytanie czy to my ludzie wciąż wykorzystujemy maszyny do pracy dla nas, czy może raczej my ludzie w naszej materialnej kulturze pracujemy już dla samopowielania i samodoskonalenia się maszyn pozostaje dość ulotnym rozróżnieniem. Zostawiając te pytania do rozważenia przez doktoranta przejdę do właściwej części recenzji.

Kompleks MRN/X rozpoznaje podwójne pęknięcia nici DNA, wiąże pęknięte nici i zbliża je ku sobie umożliwiając ich ponowne połączenie na drodze homologicznej rekombinacji lub niehomologicznego łączenia końców. Łączone ze sobą pęknięte końce mogą się znajdować w odległości nawet 120nm – odległości ogromnej w skali białek i dynamiki działania kompleksów białkowych. Dla porównania najdłuższa oś rybosomu eukariotycznego to ok. 30nm a kompleksu proteasomu – komórkowej maszynerii degradacji białek, to ok. 60nm. W obu tych przypadkach,

w przedstawionej skali, struktury te są praktycznie statyczne, a dynamika ujawnia się jedynie na znacznie niższym poziomie. W przypadku bardziej dynamicznych struktur, pojedynczy „krok” miozyny po aktywie to ok. 30-36nm, a skurcz ogonka bakteriofaga związany jest ze zmianą długości o ok. 100nm, jednak struktura tego ostatniego jest nieporównywalnie bardziej skomplikowana od struktury kompleksu MRN/X. Duży zakres dynamiki konformacyjnej Rad50 implikuje trudności w analizie strukturalnej tych zmian z uwagi na fakt, iż najbardziej zaawansowane wysokorozdzielcze metody analizy strukturalnej wymagają stabilności badanego materiału. I tak, pomimo oczywistego zainteresowania tematem środowiska naukowego, w czasie gdy doktorant formułował tematykę pracy, znana była jedynie jedna wysokorozdzielcza struktura fragmentu Rad50 obejmującego region koordynujący cynk. Dostępne były także wyniki badań metodą AFM i innymi mniej rozdzielczymi technikami, do wyjaśnienia pozostawało jednak wiele pytań z których część doktorant podejmuje w swojej pracy.

Jako mocne strony niniejszej rozprawy uważam przede wszystkim następujące aspekty:

(i) Klarowny opis - wstęp teoretyczny, opis większej części wyników, interpretacja i część metodologiczna zawierają przejrzyste skomponowaną informację na temat stanu wiedzy, wynikających ze stanu wiedzy (a właściwie stanu niewiedzy) pytań, opis prób odpowiedzi na te pytania i uzyskanych wyników. Opis przeprowadzony jest bez zbędnych szczegółów i nadmiernych uproszczeń. Ponadto, na co zwracam szczególną uwagę – praca ilustrowana jest niezwykle starannym i czytelnym materiałem graficznym na przygotowanie którego autor poświęcił z pewnością wiele czasu, a co procentuje przejrzystością prezentacji często skomplikowanych zagadnień i eksperymentów.

(ii) zastosowanie szerokiego wachlarza metod które pozostają niestety często zapomniane w obliczu sukcesów kriomikroskopii elektronowej, krystalografii, NMR i AFM, a które stanowią przecież świetne uzupełnienie tych wymienionych. Szczególnie przemawia do mnie siła przekonywania zawarta w prostocie eksperymentów których wyniki zilustrowano na rycinach 16 i 28.

(iii) opracowanie struktury krystalicznej domeny haczykowej ludzkiego białka Rad50 i walidacja eksperymentalna konkluzji funkcjonalnych wynikających z analizy struktury – badania te są doskonałym przykładem połączenia badań strukturalnych wysokiej rozdzielczości z uzupełniającymi badaniami fizykochemicznymi pozwalającymi na pełniejsze zrozumienie podejmowanych zagadnień (a ponadto świetnym przykładem wartości współpracy międzynarodowej).

(iv) Wykazanie ruchu nożycowego protomerów dimeru Rad50 modulowanego stężeniem jonów cynku w systemie drożdżowym. Wykazanie funkcjonalnej roli dodatkowej reszty cysteiny w motywie sekwencji wiążącej cynk.

(v) wykazanie zdolności jonów kadmu do wypierania jonów cynku w dimerach białka Rad50 z *P. furiosus*. Szczególnie interesujący z uwagi na potencjalne znaczenie fizjologiczne jest wynik pokazujący zdolność wypierania jonów cynku z kompleksu z Rad50 przez jony kadmu uprzednio wychwycone przez metalotioneinę.

Za słabsze strony pracy uważam:

(i) W pracy autor analizuje aspekty funkcjonalne domeny haczyka cynkowego Rad50 z trzech organizmów: *H. sapiens*, *S. cerevisiae* i *P. furiosus*. Dobór organizmów odległych ewolucyjnie sugerowałby chęć porównania właściwości analizowanych domen między tymi organizmami. Porównanie takie nie jest jednak w pracy przedstawione, a przynajmniej nie jest poprowadzone w spójny sposób. Dla każdej z domen pochodzących z poszczególnych organizmów przeprowadzono inny zestaw doświadczeń i w wielu przypadkach dobór ten jest dla mnie niejasny. Tym samym, chociaż praca sugeruje w streszczeniu porównanie międzygatunkowe, porównanie takie w samej pracy jest jedynie fragmentaryczne, niespójnie poprowadzone, a wybór obiektu badań do poszczególnych eksperymentów nie zawsze jasny. Zakładam, iż projektowi badań przyświecała ogólna idea, jednak w mojej opinii nie jest ona jednoznacznie zarysowana w pracy. Np. analiza roli dodatkowej reszty cysteiny w motywie sekwencji wiążącej cynk jest przeprowadzona dla białka drożdżowego, podczas gdy reszta ta występuje także w białku ludzkim. Tutaj aż prosi się o równoległą analizę eksperymentalną obu białek lub chociaż porównanie konkluzji wybranych eksperymentów prowadzonych na białku drożdżowym dla białka ludzkiego. W ostatniej części pracy autor bada toksyczny wpływ kadmu używając do tego jedynie białka z archeonta. O ile ciekawsze wyniki można by osiągnąć porównując wyniki dla białek archeonta, drożdży i człowieka!

(ii) Brak zaangażowania metod wysokorozdzielczej biologii strukturalnej w charakterystykę indukowanego zmianą stężenia jonów cynku ruchu nożycowego Rad50. Układ eksperymentalny stosowany przez autora wydaje się idealny do analizy zmian strukturalnych metodą NMR (określenie struktur obu form metodą NMR w podejściu podobnym jak prezentowane w rozdziale 4.3.5.1). Podejścia takiego zabrakło jednak w pracy.

(iii) Wymiana jonów cynku na jony kadmu w strukturze haczyka cynkowego Rad50 jest dobrze udokumentowana. W mojej ocenie zmiany strukturalne indukowane wymianą jonów są udokumentowane mniej przekonująco – szczególnie jeśli chodzi o analizę strukturalną NMR. Nie umiem ocenić czy wynika to ze zbyt zdawkowego przedstawienia w rozprawie (autor prezentuje skrótowo wyniki uzyskane przez współpracowników – co jasno zaznacza) czy niewystarczających danych eksperymentalnych. Autor prezentuje struktury NMR kompleksów zawierających jony cynku i jony kadmu, jednak rycina 51 uwidacznia jedynie niewielkie zmiany w dystalnych częściach analizowanych peptydów. Warto byłoby przedstawić nałożenie wybranych struktur, co wskazywałoby jednoznacznie o jakich zmianach mowa – rysunek jest trudny w interpretacji. Co jednak znacznie ważniejsze, bez przedstawienia widm na podstawie których stworzone zostały listy stosowanych więzów trudno ocenić na ile obserwowane różnice struktur są istotne. Obliczenia strukturalne w NMR bywają bardzo czułe na pojedyncze więzy, szczególnie w terminalnych fragmentach łańcucha peptydowego. Niewykluczone, że obserwowane zmiany w ułożeniu końców peptydu są po prostu wynikiem uwzględnienia pojedynczego, słabo zdefiniowanego więzu w jednej ze struktur? Z pewnością warto byłoby przeanalizować struktury dłuższych peptydów. Szkoda, że to zagadnienie nie jest bardziej rozwinięte – być może to nie zmiany strukturalne ale zmiana stabilności kompleksu wpływa na

jego funkcję? Byłoby to wytłumaczenie znacznie prostsze i znacznie lepiej udokumentowane w rozprawie. Proszę by autor odniósł się do tych zagadnień podczas obrony.

Na koniec, w pracy zabrakło mi wykazu osiągnięć autora. Nie jest to może element konieczny, niemniej uważam iż swoje osiągnięcia warto promować. Mgr Padjasek jest autorem 4 prac eksperymentalnych i jednej pracy przeglądowej, co jest osiągnięciem niebagatelnym. Trzy z tych prac dokumentują znaczącą część wyników przedstawionych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę uważam za bardzo dobrą i godną wyróżnienia. Odniesienie się do krytycznych uwag zawartych w recenzji pozwoliłoby zapewne uczynić ją jeszcze lepszą/ciekawszą/pełniejszą. Oczywiście jest jednak, iż zawsze istnieją ograniczenia czasowe i logistyczne, tak że nie jest możliwe wykonanie wszystkich możliwych eksperymentów i analiza wszystkich możliwych podejść. Być może uwagi te mogą stanowić wskazówkę do dalszych badań.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magistra Michała Padjaska spełnia wszelkie warunki stawiane pracom doktorskim zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa i normami zwyczajowymi. Według mojej oceny dorobek naukowy kandydata oraz przedstawiona rozprawa uzasadniają nadanie mu stopnia naukowego doktora. Dlatego wnoszę o dopuszczenie pana magistra Michała Padjaska do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wagę i nowatorski charakter uzyskanych wyników naukowych, doskonale opracowanie rozprawy i zaangażowanie doktoranta w pracę naukową wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

prof. dr hab. Grzegorz Dubin
Kierownik Grupy Badawczej
Krystalografii Białek MCB UJ