



Poznań, dn. 6-08-2020

Dr hab. Agnieszka Kiliszek
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Justyny Czyrko-Horczak
pt.: „Charakterystyka biochemiczna i strukturalna hydrolaz S-adenozylu- L-homocysteiny
pochodzących z wybranych mikroorganizmów”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierunkiem dr. hab. Krzysztofa Brzezińskiego. Jest to zbiór trzech publikacji poprzedzony szczegółowym opisem zadań wykonywanych przez doktorantkę. Dotyczą one charakterystyki biochemicznej i strukturalnej hydrolaz S-adenozylu-L-homocysteiny (SAHazy) pochodzących z trzech organizmów bakteryjnych: *Thermotoga maritima*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Cytophaga hutchinsonii*.

Białko SAHaza jest enzymem występującym we wszystkich organizmach. Zaangażowane jest w proces regulacji metylacji, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania organizmu reakcji zachodzącej w komórce. SAHaza rozkłada cząsteczkę S-adenozylu-L-homocysteiny (SAH), która jest produktem i jednocześnie inhibitorem procesu metylacji. Jego akumulacja może powodować nieprawidłowe funkcjonowanie komórki, dlatego regulacja jego poziomu jest tak istotna. SAHaza rozkłada SAH do adenozyliny i L-homocysteiny, które następnie są włączane w inne szlaki metaboliczne. Enzym do swej aktywności wymaga związania kofaktora dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie utlenionej (NAD⁺). Ma również zdolność przeprowadzania reakcji odwrotnej, syntezy SAH, i w warunkach *in vitro* aktywność ta dominuje nad aktywnością hydrolityczną.

SAHazy ze względu na ich istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki są atrakcyjnym celem badań biomedycznych. Selektywne zahamowanie ich aktywności pozwoliłoby na walkę z patogennymi organizmami. Niestety enzymy te wykazują duże podobieństwo strukturalne niezależnie od organizmu, co utrudnia projektowanie specyficznych inhibitorów. Z tego względu rozwój innych strategii jest niezbędny. W laboratorium kierowanym przez dr. hab. Krzysztofa Brzezińskiego prowadzone są badania, które mają odpowiedzieć na pytanie, czy możliwe jest znalezienie różnic biochemicznych i strukturalnych pomiędzy SAHazą ludzką a SAHazami bakteryjnymi.

Mgr Justyna Czyrko-Horczak, w ramach doktoratu, skupiła swoją uwagę na SAHazach bakteryjnych. Do recenzji przedstawiła trzy prace eksperymentalne o łącznym IF ok. 10. Prezentowana tematyka jest spójna a zadania badawcze oraz udział doktorantki w poszczególnych

publikacjach jasno określony. W pierwszej publikacji doktorantka jest drugim autorem a w dwóch pozostałych pierwszym. Na podstawie oświadczeń autorów można stwierdzić, że w przypadku dwóch pierwszych artykułów doktorantka miała znaczący wkład w część biochemiczną, a w trzecim artykule jej rola była kluczowa.

Praca doktorska rozpoczyna się opisem osiągnięcia naukowego, który jest podzielony według schematu: wstęp, cele naukowe, metodyka badań oraz omówienie wyników badań. Jest to podział klasyczny spotykany często w opracowaniach naukowych. W mojej opinii, opis ten czyta się jednak z pewnym utrudnieniem. Informacje związane z danym projektem są porzucane, nieścisłe, niejasne lub powtarzające się. Przykładowo w metodyce badań doktorantka nie umieściła, że przeprowadzała test inaktywacji PaSAHazy przy użyciu 2'-deoksyadenozyny w obecności jonów Rb^+ oraz K^+ ale przy omawianiu wyników już tak. Z kolei w celach naukowych dwukrotnie je wymienia. Doktorantka nie uniknęła również błędów stylistycznych, językowych czy merytorycznych. Przykładowo (strona 20, drugi akapit): „W przypadku badania aktywności syntetycznej SAHazy z *T. maritima* (...)”. Doktorantce chodziło raczej o syntetyczną aktywność SAHazy a nie o syntetyczną SAHazę. Kolejny przykład to (strona 23, drugi akapit): „Równoległe z prowadzonymi przeze mnie badaniami dr hab. Krzysztof Brzeziński rozwiązał struktury krystaliczne iTmSAHazy w kompleksie z NAD^+ oraz NAD^+/Ado .” Doktorantce chodziło raczej o formę zredukowaną kofaktora NADH? Nie zgadzam się ze zdaniem (strona 21, drugi akapit): „Uzyskany model został automatycznie wbudowany w mapę gęstości elektronowej (...)”. Czy doktorantka mogłaby wyjaśnić to zdanie lub przedstawić poprawną wersję?

Pierwsza praca przedstawiona do oceny została opublikowana w *International Journal of Biological Macromolecules* (IF ok. 5,2). Dotyczy ona procesu termoaktywacji SAHazy pochodzącej z bakterii termofilnej *Thermotoga maritima*. W ramach wykonywanych zadań doktorantka była zaangażowana w proces ekspresji i oczyszczania białka, badania jego aktywności katalitycznej oraz przeprowadzenie pomiarów dystrybucji wielkości cząsteczek białka w roztworze techniką dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Wykonała również serię porównań struktur krystalicznych tego enzymu. Na początku swoich badań, doktorantka otrzymała preparat, który, pomimo wysokiej czystości, nie wykazywał aktywności katalitycznej. Ze względu na ekstremofilny profil organizmu, z którego pochodzi enzym, sprawdziła jego aktywność w wyższych temperaturach. W tym celu wykorzystwała aktywność syntetyczną enzymu oraz chromatografię HPLC do rozdzielenia substratów i produktów reakcji. W przeprowadzonych testach enzym nadal był nieaktywny. Na podstawie struktury krystalicznej uzyskanej przez dr. hab. Krzysztofa Brzezińskiego oraz wykonaniu przez doktorantkę analizy stopnia utlenienia kofaktora, mgr Justyna Czyrko-Horczał zaproponowała wytłumaczenie tego zjawiska. Brak aktywności enzymu wynika z niepoprawnego ułożenia poszczególnych domen podjednostki białka względem siebie, związania kofaktora w formie zredukowanej oraz występowania dwóch podjednostek enzymu w formie zamkniętej, co uniemożliwia wiązanie substratów. Na tej podstawie uprościła proces oczyszczania enzymu poprzez pominięcie etapu wymywania ligandów, a badania aktywności enzymu wykonywała z dodatkiem kofaktora w formie utlenionej. Przeprowadzone testy wykazały, że enzym jest aktywny, ale tylko w wysokiej temperaturze i w obecności NAD^+ . W ten sposób doktorantka potwierdziła swoje założenia, w którym enzym musi być termoaktywowany, ponieważ tylko wtedy prawidłowo się fałduje i w efekcie ma zdolność wiązania wszystkich ligandów i przeprowadzania reakcji enzymatycznej. Dodatkowo doktorantka prześledziła zmiany konformacyjne enzymu w roztworze poprzez pomiary wielkości białka metodą DLS w różnych warunkach temperaturowych.

Druga załączona publikacja została opublikowana w Scientific Reports (IF ok. 4) i dotyczy identyfikacji i wyjaśnienia roli kationów metali alkalicznych oraz cynku w aktywności i inhibicji SAHazy z *P. aeruginosa* (PaSAHaza). Cel tych badań został sformułowany na podstawie analizy struktur krystalicznych SAHaz, w których w większości przypadków białko przyjmowało konformację zamkniętą, ze związanymi cząsteczkami adenozyiny (produkt reakcji hydrolizy SAH) oraz jonami jednowartościowymi zlokalizowanymi w bliskiej odległości od miejsca wiązania substratów. Jedynie w kilku przypadkach enzym wykrył w formie otwartej bez związanych kationów czy substratów/produktów. Na tej podstawie doktorantka podjęła się charakterystyki enzymatycznej SAHaz i określenia, który jon/jony jednowartościowe uczestniczą w reakcji hydrolizy SAH i jaka jest ich rola w tym procesie. Badania rozpoczęła od produkcji i oczyszczania enzymu. Otrzymany preparat białkowy był nieaktywny. Analiza spektrofluorymetryczna stopnia utlenienia kofaktora wykazała, że występuje on w formie utlenionej wymaganej do aktywności enzymu. Fakt ten był zaskakujący, ponieważ czynnik powodujący inhibicję enzymu pozostał niezidentyfikowany. Ponownie badania krystalograficzne przeprowadzone przez dr. hab. Krzysztofa Brzezińskiego pozwoliły na jego identyfikację. Okazało się, że w pobliżu regionu centrum aktywnego PaSAHazy znajduje się jon Zn^{2+} , który może hamować aktywność białka. Doktorantka podjęła próbę usunięcia kationu i udało jej się to dopiero za pomocą odczynnika TPEN. Tak przygotowane białko było aktywne i gotowe do ewaluacji enzymatycznej. Badania kinetyki reakcji rozkładu SAH w obecności jonów metali alkalicznych wskazały, że w obecności jonów K^+ , enzym osiąga maksymalną aktywność, natomiast jony Rb^+ inhibują jego działanie. Na podstawie wyników ITC, struktur krystalicznych, spektroskopii NMR przeprowadzonych przez współautorów publikacji i badań kinetyki muteiny Gln65Ala (wcześniej otrzymanej przez doktorantkę), a także przesłania danych literaturowych, mgr Justyna Czyrko-Horczak zaproponowała mechanizm, według którego jony regulują aktywność PaSAHazy. Mianowicie jony K^+ zapewniają odpowiednie właściwości dynamiczne białka. Optymalnie stabilizują kompleks enzym-substrat w konformacji zamkniętej umożliwiając zajście reakcji katalitycznej. W przypadku jonów o mniejszym promieniu jonowym (Li^+ i Na^+) stabilizacja kompleksu enzym-substrat jest słabsza. Dla jonów Cs^+ o większym promieniu jonowym niż kation K^+ kompleks tworzy się mniej efektywnie. Z kolei jon Rb^+ , którego promień jonowy jest nieznacznie większy niż K^+ , za mocno stabilizuje kompleks inhibując działanie SAHazy. Swoje założenia doktorantka udowodniła eksperymentalnie, śledząc tempo wymiany cząsteczki adenozyiny na 2'-deoksyadenozynę oraz tempa wiązania 2'-deoksyadenozyiny. Dla jonów Zn^{2+} , doktorantka, przeprowadziła ten sam eksperyment, który wykazał, że jony, podobnie jak Rb^+ , inhibują aktywność enzymu poprzez utrzymanie go w nieaktywnej, zamkniętej konformacji.

W trzeciej publikacji, która ukazała się w *Croatia Chemica Acta* (IF ok. 0,8) doktorantka przeprowadziła analizę aktywności hydrolitycznej SAHazy z bakterii *Cytophaga hutchinsonii* (ChSAHazy) oraz badania biokrystalograficzne tego enzymu. W trakcie wykonywanych prac doktorantka miała problem z uzyskaniem odpowiednich ilości białka. Ustaliła, że przyczyną było zbyt wysokie stężenie enzymu w roztworze powodujące jego wytrącanie. Dlatego istotne było utrzymywanie stężenia ChSAHazy poniżej 8 mg/mL. Analiza strukturalna wykazała, że uzyskany model jest podobny do wcześniej uzyskanych struktur krystalicznych SAHaz pochodzących z innych organizmów.

W mojej ocenie, w przypadku pierwszych dwóch artykułów, mgr Justyna Czyrko-Horczak uczestniczyła w interesujących badaniach, w których obserwacje krystalograficzne wzajemnie

wzbogacone były badaniami biochemicznymi. Wysoko cenię takie podejście multidyscyplinarne, świadczące o bardzo wysokim poziomie prowadzonych badań. Jest to również odzwierciedlone w randze czasopism, w których ukazały się prezentowane doniesienia. W wykonywanych przez doktorantkę zadaniach najbardziej doceniam jej wkład w wyjaśnienie roli jonów jednowartościowych i Zn^{2+} w aktywności PaSAHazy. Podjęty cel był ambitny i niezwykle interesujący. Jej wkład w zrozumienie procesu termoaktywacji enzymu z *T. maritima* jest również zauważalny. W przypadku trzeciej publikacji, pomimo kluczowej roli doktorantki, która wykazała się przede wszystkim znajomością warsztatu biokrytalograficznego, z naukowego punktu widzenia cenię tę pracę najmniej. Uważam, że podjęcie krótkiej dyskusji uzyskanych wyników znacznie wzbogaciłoby tę publikację. Być może doktorantka mogłaby przeanalizować wyniki testu enzymatycznego jak i obecność pseudotranslacji w szerszym kontekście, porównać to z innymi SAHazami?

Mam szereg pytań i uwag, które nasunęły mi się w trakcie recenzowania przedłożonego mi do oceny doktoratu:

1. Czy doktorantka mogłaby podsumować swoje wyniki w kontekście badań nad rozwojem nowych strategii inhibicji SAHaz? Czy jej wyniki przyczyniły się do odpowiedzi na pytanie o różnice strukturalne i biochemiczne pomiędzy enzymem ludzkim a bakteryjnym?
2. Czy działanie bramki molekularnej jest niezależne od konformacji białka? Tzn. w formie otwartej białka bramka może być zamknięta a w formie zamkniętej otwarta?
3. W kilku miejscach doktorantka napisała, że opracowała metodę czy procedurę. Chciałabym, aby doktorantka uściśliła, co miała na myśli. Jeśli opracowała metodę to co było w niej nowatorskiego?
4. Jak doktorantka przygotowywała próbki do analizy HPLC?
5. Doktorantka do analizy stanów oligomerycznych stosowała metodę ultrafiltracji i sączenia molekularnego. Uważam, że metody te są mało wiarygodne, w szczególności ultrafiltracja. W przypadku sączenia molekularnego brakuje eksperymentu kontrolnego. Dlaczego doktorantka nie wykonała żelu natywnego otrzymanych preparatów? Jakie inne bardziej wiarygodne metody mogłaby wykorzystać w tym celu?
6. Kontynuując powyższy wątek. Doktorantka dla SAHazy z *T. maritima* wykonała pomiar za pomocą techniki DLS. W Metodycie twierdzi, że wykonała pomiar w zależności od stężenia białka. Tego wyniku nie dopatrzyłam się w dalszej części doktoratu. Ponadto Rysunek 4. nie różni się zasadniczo od tego przedstawionego w publikacji. Doktorantka mogłaby lepiej dostosować skalę osi x, z której wówczas można by odczytać wartości. Poza tym, patrząc na wykres, nie widać istotnych różnic pomiędzy preparatami białka. Mogę się zgodzić, że maksima nie są w tym samym miejscu, ale w pomiarach DLS, wiele zależy od warunków pomiaru, ilości wykonanych powtórzeń jak i samych obliczeń. Z tego względu brakuje mi szczegółów dotyczących tego eksperymentu. Czy doktorantka mogłaby przedstawić informację o ilości wykonanych powtórek, wykresy dystrybucji wielkości od intensywności a także podsumowanie rezultatów danego pomiaru (np. obliczony promień, masa, jakość pomiaru, dyspersyjność próbki)? Czy doktorantka mogłaby odnieść te wyniki do struktur krystalicznych? Jakie są różnice w rozmiarach modeli nieaktywnej, otwartej i zamkniętej formy białka? Czy doktorantka brała pod uwagę, że pomiar prowadzony w wyższej temperaturze może generować przesunięcia piku?
7. Czy doktorantka zastanawiała się dlaczego w preparacie nieaktywnej iTmSAHazy związane były dwie cząsteczki kofaktora w formie zredukowanej? Czy mógłby on odgrywać jakąś rolę w procesie zwijania się białka?

8. Dlaczego znając doniesienia literaturowe doktorantka już na samym początku nie podjęła prób podgrzewania preparatu w trakcie jego oczyszczania?
9. Czy doktorantka mogłaby przedstawić procedurę oczyszczania i krystalizacji aktywnej TmSAHazy? Skąd wiadomo, że enzym jest aktywny, jeżeli krystalizacja była podejmowana znacznie poniżej 358K? Wyniki doktorantki wskazują, że podgrzanie i schłodzenie enzymu nie zapewnia aktywności enzymatycznej. Wykonując testy aktywności enzymu w obecności NAD⁺, w którym momencie doktorantka dodawała kofaktor?
10. Nie zgadzam się z opisem wyników ITC wykonanych dla iTmSAHazy. W mojej opinii w pomiarach ITC nie następowała zmiana stechiometrii wiązania ligandów. Jest to jedynie spekulacja. Dodatkowo, po podgrzaniu i schłodzeniu enzymu, obserwuje się raczej zwiększenie wkładu entropowego a nie całkowita zmiana udziału entalpowego na entropowy. Czy doktorantka mogłaby się do tego odnieść?
11. Rysunek 7. na osi y: brakuje jednostek.
12. Odnośnie badań nad PaSAHazą zastawia mnie obecność jonów Zn²⁺ w strukturze. Na jakim etapie uzyskiwania preparatu zostały one związane? Jeśli miało to miejsce w komórce bakteryjnej to dlaczego inne struktury SAHaz nie mają tego jonu? Czy bakterie *P. aeruginosa* mogą mieć wytworzone jakieś mechanizmy chroniące je przed inaktywacją enzymu?
13. Czy badano powinowactwo jonów dla SAHaz? Co by się wydarzyło, gdyby inkubować białko z mieszaniną jonów jednowartościowych? Co związałyby się w strukturze?
14. Odnośnie upakowania cząsteczek ChSAHazy: jak wpłynie na sieć krystaliczną (czy zostałyby zachowana grupa przestrzenna), zmiana wektor translacyjny na 0, 0,5 0,5 lub gdyby oś tetrameru ABA'B' pokryła się z osią śrubową wzdłuż osi x?

Zanim przejdę do wniosku końcowego chciałam wspomnieć o aktywności naukowej doktorantki. Była wykonawcą w jednym projekcie naukowym NCN oraz jest współautorem dwóch zgłoszeń patentowych. Aktywnie uczestniczyła w konferencjach naukowych oraz odbyła staż naukowy w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w 2017 roku.

Podsumowując, na podstawie przedstawionej pracy doktorskiej mgr Justyny Czyrko-HorczaK, mogę stwierdzić, że doktorantka wykazała się umiejętnością posługiwania się technikami biochemicznymi oraz biokrytalograficznymi. Samodzielnie rozwiązała wiele problemów badawczych pokazując swój kunszt naukowy. Z tego względu uważam, że w myśl Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dn. 14 marca 2003 r. oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i późniejszymi zmianami ogłoszonym w Dzienniku Ustaw z września 2017 r., poz. 1789, rozdz. 2, art. 13 przedłożona mi do oceny praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Justyny Czyrko-HorczaK do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Agnieszka Kilińska