

Warszawa 6.08.2020

Dr hab. Elżbieta Nowak  
Laboratorium Struktury Białka  
Międzynarodowy Instytut Biologii  
Molekularnej i Komórkowej w Warszawie  
e-mail: [enowak@iimcb.gov.pl](mailto:enowak@iimcb.gov.pl)  
tel: (48) 22 5970721

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

Przedstawiona mi do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem dra hab. Krzysztofa Brzezińskiego w Laboratorium Biochemii i Biologii Strukturalnej na wydziale Chemii Uniwersytetu w Białymstoku.

Przedmiotem badań doktorantki były SAHazy pochodzące z trzech różnych organizmów, *Thermatoga maritima*, *Pseudomonas aeuroginosa* i *Cytophaga hutchinsonii*. Enzym ten jest odpowiedzialny za rozkład S-adenozyl-L-homocysteiny, która jest inhibitorem procesów metylacji w komórkach człowieka jak i wielu patogenów. Jak wiadomo, prawidłowy przebieg procesów metylacji odgrywa decydującą rolę dla sprawnego funkcjonowania komórek. Selektywne zablokowanie aktywności SAHaz w organizmach patogennych mogłoby prowadzić do zahamowania lub spowolnienia procesów metylacji, a więc stworzyłoby możliwość walki z tymi organizmami na poziomie molekularnym.

Z kolei zbyt wysokie stężenie produktu reakcji hydrolizy SAH w komórkach ludzkich, L-homocysteiny, jest kojarzone z wieloma chorobami tj: miażdżycą tętnic, chorobami neurodegeneracyjnymi czy też nowotworami. Wszystko to stanowi, iż SAHaza jest wciąż interesującym obiektem badań. Literatura na temat SAHaz jest bogata, a struktury tego enzymu są znane dla wielu organizmów, zarówno eukariotycznych jak i bakteryjnych. Przedstawione badania są kontynuacją zainteresowań Promotora.

Przedłożona praca doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, celu i metodyki badań, skrótowego omówienia artykułów wchodzących w skład rozprawy, podsumowania oraz spisu literatury. Dołączone zostały również trzy publikacje, będące przedmiotem oceny naukowej. Są to oryginalne zespołowe prace

naukowe z lat 2017-2018 opublikowane w czasopismach z listy Journal Citation Report: *International Journal of Biological Macromolecules*, *Scientific Reports* oraz *Croatica Chemica Acta*. Sumaryczny impact factor to 8,75, co jest wynikiem dobrym o ile nie bardzo dobrym. Warto podkreślić spójność tematyczną prac jak i czasopism, w których zostały opublikowane. W pierwszej pracy Doktorantka jest jednym ze współautorów, w kolejnych dwóch pierwszym autorem co wskazuje na Jej znaczący udział w prowadzeniu badań jak i przygotowaniu manuskryptów. Wszystkie załączone prace opisują badania strukturalne i biochemiczne w/w SAHaz. Jak wynika z załączonych oświadczeń w każdej z prezentowanych prac Doktorantka oczyściła białka i przeprowadziła ich charakterystykę biochemiczną. W ostatnim artykule Doktorantka miała okazję poznać warsztat krystalograficzny i rozwiązała strukturę SAHazy z *C. hutchinsonii*.

Ponieważ każda z prac była wnikliwie analizowana i oceniana przez edytorów oraz co najmniej dwóch recenzentów zrezygnuję z ich bardzo szczegółowej oceny. Są to solidnie wykonane, dobre i bardzo dobre prace.

W pierwszej z omawianych prac (opublikowanej w *International Journal of Biological Macromolecules*) opisano struktury SAHazy z *T. maritima* w kompleksie z adenozyzną i zredukowaną formą kofaktora NADH, jak i z samym kofaktorem NADH. W obu przypadkach, oczyszczone w temperaturze pokojowej białko było niepoprawnie sfałdowane i pozbawione aktywności katalitycznej. Badania biochemiczne z wykorzystaniem miareczkowania kalorymetrycznego ITC i DLS (ang. Dynamic Light Scattering) wykazały, że przywrócenie aktywnej konformacji następuje po podgrzaniu i inkubacji enzymu w 85 °C przy jednoczesnej obecności kofaktora w formie utlenionej NAD<sup>+</sup>, co jest ciekawym ale i trochę oczekiwanym wynikiem w przypadku badań białek termofilnych.

Porównanie struktur termofilnej aktywnej SAHazy (opublikowanej przez inną grupę badawczą) i jej nieaktywnej formy pozwoliło na wyjaśnienie mechanizmu termoaktywacji enzymu na poziomie molekularnym, który polega na rearanżacji domen względem siebie i związaniu kofaktora we wszystkich podjednostkach. Warto podkreślić, iż wyniki badań przedstawionych w tej publikacji były podstawą dwóch zgłoszeń patentowych.

W kolejnej pracy (opublikowanej w *Scientific Reports*) przedstawiono serię struktur SAHazy z *P. aeuroginosa* w obecności ligandów i różnych jonów metalicznych. Jest to moim zdaniem najciekawsza z prezentowanych prac. Wykorzystując analizę strukturalną, spektroskopię <sup>23</sup>Na NMR oraz pomiary anizotropii fluorescencji (pozwalającej oszacować dynamikę

konformacyjną cząsteczki białka pomiędzy formą zamkniętą i otwartą) wyjaśniono dlaczego aktywność enzymu jest optymalna w obecności jonów  $K^+$ , podczas gdy jony  $Rb^+$  inhibują enzym, pomimo podobnej wartości promienia jonowego. Obecność jonów  $K^+$  powoduje, iż enzym oscyluje optymalnie dla przebiegu cyklu katalitycznego, natomiast w obecności jonów  $Rb^+$  te oscylacje są zbyt wolne, a dla innych metali tj:  $Li^+$ ,  $Na^+$  są zbyt szybkie. Jest to bardzo wartościowy wynik, obrazujący rolę jonów metali w funkcjonowaniu białek. Ponadto analiza strukturalna pozwoliła na wyjaśnienie mechanizmu inhibicji enzymu przez jony  $Zn^{2+}$ , które blokują "bramkę molekularną", utworzoną przez His-Phe utrzymując enzym w zamkniętej, nieaktywnej konformacji.

Ostatnia praca opublikowana w *Croatia Chemica Acta* jest ciekawa z krystalograficznego punktu widzenia. Przeprowadzono w niej analizę strukturalną SAHazy z *C.hutchinsonii*, która w kryształach przyjmuje konformację zamkniętą ze związanym kofaktorem NAD w formie utlenionej i cząsteczką adenozyliny. W komórce elementarnej zidentyfikowano dwa dimery powiązane niekrystalograficzną symetrią translacyjną. Aktywna forma białka czyli tetramer jest generowany przez dwie różne osie krystalograficzne. Podejrzewam, że praca nad tą strukturą nie była trywialna.

Wstęp i omówienie publikacji są napisane w sposób jasny, klarowny i praktycznie bezbłędny z wyjątkiem drobnego przejęzyczenia na stronie 30. Na stronie 34 Doktorantka używa pojęcia objętości Matthews'a przy czym poprawnie byłoby użycie terminu „współczynnika Matthews'a". Pewien niedosyt pozostawia, brak zbiorczej dyskusji opublikowanych wyników.

Pytania i uwagi:

1. Sądząc po r.m.s.d prezentowane enzymy SAHaz wykazują duże podobieństwo strukturalne. Jak duże jest podobieństwo na poziomie sekwencyjnym?
2. W przypadku PaSAHazy jony  $Zn^{2+}$  wpływają na zahamowanie aktywności enzymu. Czy inne jony dwuwartościowe takie jak:  $Mg^{2+}$  czy  $Mn^{2+}$  też mogą mieć taki wpływ?
3. Głównym celem badań nad kolejnymi SAHazami jest zaprojektowanie selektywnych inhibitorów tego enzymu. Czy struktury, które zostały zaprezentowane w opublikowanych pracach i dostępne dane strukturalne w PDB pozwoliły na rozwinięcie prac w tym kierunku?

4. Przy omawianiu metod charakteryzujących stan oligomeryczny białka wymieniana jest metoda odpowiedniego doboru membran na podstawie średnicy porów do zagęszczania białka. W tym miejscu byłabym ostrożna i nie nazywałabym tego metodą, gdyż nie wszystkie białka są w pełni globularne i znane są mi przypadki, że białko „przeszło” przez membranę, choć teoretycznie nie powinno. Może to być potraktowane raczej jako wskazówka. Oczywiście Doktorantka użyła bardziej precyzyjnych metod do określenia oligomeryzacji białka.

Podsumowując, uważam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska Pani mgr Justyny Czyrko-Horczak spełnia wszystkie formalne i naukowe wymogi prac doktorskich określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów postępowania.

Elżbieta Nowak