

Prof. dr hab. Wojciech Rypniewski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Zakład Struktury i Funkcji Biomolekuł
e-mail: wojtekr@ibch.poznan.pl
tel: (48) 61-8528503
fax: (48) 61-8520532

**Ocena osiągnięcia habilitacyjnego oraz całokształtu dorobku naukowego,
dydaktycznego i organizacyjnego dr. Krzysztofa Brzezińskiego**

Sylwetka naukowa habilitanta. Dr Krzysztof Brzeziński jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. W 2000 roku uzyskał tam tytuł zawodowy magistra. Promotorem był prof. Mariusz Jaskólski, a tytuł jego pracy magisterskiej brzmiał „Ekspresja S-adenozyl-L-homocysteinazy z łubinu żółtego zawierającej znacznik histydynowy”. Zwracam na to uwagę, żeby podkreślić, że tematyka SAHazy, którą kandydat zajmuje się później, pojawia się na samym początku jego kariery naukowej. W roku 2006 kandydat obronił rozprawę doktorską pt. „Badania biochemiczne i krystalograficzne SAHazy i fukozylotransferazy NodZ, białek z układu symbiotycznego roślina – bakteria” na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza i otrzymał stopień doktora nauk chemicznych. Promotorem tej pracy także był prof. Mariusz Jaskólski. Następnie dr Brzeziński został Starszym Specjalistą w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, w Centrum Badań Biokrystalograficznych, z dwuletnią przerwą na staż zagraniczny, który odbył jako *Postdoctoral Fellow* w NIH/NCI przy synchrotronie w Argonne. Pracował tam pod kierunkiem dr. hab. Zbigniewa Dautera. W 2012 roku kandydat objął stanowisko adiunkta w Instytucie Chemii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. W 2019 roku przeniósł się na kilka miesięcy do IChB PAN, ale wrócił do Białegostoku realizować projekt badawczy w ramach programu NCN SONATA BIS.

Ocena osiągnięcia habilitacyjnego.

Dorobek habilitanta przedstawiony jest w obszernym autoreferacie. Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe nosi tytuł „Charakterystyka strukturalna makromolekuł biologicznych wiążących lub zawierających *N*-glikozydowe pochodne β -D-rybofuranozy” i składa się z sześciu publikacji, które ukazały się w latach 2011-2018. W czterech z nich habilitant jest autorem wiodącym, a w jednej jest autorem korespondującym. Jedna praca ukazała się w bardzo wymagającym czasopiśmie *Nucleic Acids Research*, cztery w *Acta Crystallographica*

D, jedna w *Scientific Reports* i jedna w *International Journal of Biological Macromolecules*. Wszystkie te czasopisma są notowane w bazie *Journal Citation Reports* i mają dobrą lub bardzo dobrą renomę. Trzeba przy okazji wyjaśnić, że choć *Acta Cryst. D* jest klasycznym czasopismem o utrwalonej renomie, to w latach 2010-2013 jego czynnik oddziaływania (IF) był anomalnie wysoki dzięki jednej, bardzo często cytowanej publikacji. Pięcioletni IF prawidłowo oddaje średnią i długoterminową cytowalność dla tego czasopisma. Ta wartość IF to około 3.

Trzy z przedłożonych publikacji habilitanta opisują badania strukturalne hydrolazy S-adenozyl-L-homocysteiny (SAHazy) z różnych organizmów: z rośliny motylkowej, z gronkowca złocistego i z hipertermofilnej bakterii *Thermotoga maritima*, żyjącej przy hydrotermalnych kominach na morskim dnie. Jedna praca opisuje strukturę czynnika nodulacji w kompleksach z GDP i jego pochodną, jedna praca opisuje strukturę białka PriB, uczestniczącego w inicjacji replikacji DNA w bakterii i jedna praca dotyczy wysokorozdzielczej struktury oligomeru DNA. Ze zbiorem publikacji przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne związanych jest 14 modeli struktur biologicznych zdeponowanych w bazie *Protein Data Bank*.

Wspólnym motywem przedstawionych prac jest, że mamy w nich do czynienia z wiązaniem *N*-glikozydowych pochodnych rybofuranozy, w formie nukleotydów, nukleozydów i ich pochodnych, jako substraty bądź kofaktory w metabolizmie, albo mamy do czynienia z wiązaniem jednoniciowego DNA, albo mamy strukturę dupletu DNA. Choć dla biologa są to bardzo różne cząsteczki, to dla chemika są one podobne w sposób oczywisty. Różnorodność ról jakie pełnią w organizmach może pobudzić biologa do refleksji o funkcji *N*-glikozydowych pochodnych β -rybofuranozy na wczesnych etapach powstawania życia na Ziemi. Habilitant poświęca biogenezie sporo uwagi we wprowadzeniu do swojego autoreferatu. Jest to ciekawa lektura. Wprowadzenie do autoreferatu samo w sobie stanowi interesujący artykuł przeglądowy przedstawiający ewolucję *N*-glikozydowych pochodnych rybofuranozy począwszy od hipotetycznych początków życia na Ziemi, poprzez późniejszą ewolucję, kiedy istotną rolę zaczęły odgrywać białka, po znane nam dziś procesy, do których nawiązują badania przeprowadzone przez habilitanta. W kontekście SAHazy habilitant przytacza m.in. opinię, że w hipotetycznym „ostatnim uniwersalnym wspólnym przodku” wszystkich współczesnych organizmów komórkowych około 30% enzymów prawdopodobnie było zależne od S-adenozylometioniny. Inną cechą łączącą badania habilitanta nad SAHazą i fukuzylotransferazą NodZ jest obecność motywu Rossmanna jako elementu wiążącego ligand nukleotydowy bądź nukleozydowy.

Miał omawiać po kolei publikacje przedstawione jako osiągnięcie habilitacyjne habilitant omawia uzyskane przez siebie wyniki w aspektach bardziej ogólnych, takich jak charakterystyka wiązania ligandów i kofaktorów do badanych białek, motyw Rossmanna, który występuje w tych pracach kilkakrotnie: w obu domenach SAHazy, gdzie jedna wiąże substrat a druga kofaktor, i w fukozylotransferazie NodZ, w miejscu wiązania substratu. Habilitant analizuje kwestie dostępności miejsc wiązania do ligandów, formy oligomeryczne pokrewnych białek, kwestię poprawności fałdowania białka i rolę kationów metali w funkcji i strukturze analizowanych białek. Osobno pisze o badaniach wysokorozdzielczych, które przeprowadził na kryształach Z-DNA. Podkreśla też aspekt interdyscyplinarności przeprowadzonych prac, gdyż oprócz krystalografii stosował mikrokalorymetrię i spektroskopię NMR, oraz oczywiście standardowe metody biologii molekularnej, niezbędne do otrzymania preparatów białkowych do dalszych badań. Takie tematyczne przedstawienie dorobku, w odróżnieniu od omawiania publikacji po kolei, daje ciekawą perspektywę na otrzymane wyniki.

SAHaza jest przykładem złożonego enzymu, gdzie rzeczywiście stykają się różne zagadnienia biologii strukturalnej, począwszy od zjawiska wymiany domen (*domain swapping*), które w tym przypadku służy dimeryzacji, gdyż enzym, w zależności od pochodzenia, jest dimerem albo tetramerem, który można traktować jako „dimer dimerów”. Następną kwestią jest zależność enzymu od kofaktora, którym w tym przypadku jest NAD⁺. Jest to związane z podziałem łańcucha polipeptydowego na dwie domeny, z których każdy zawiera fałd Rossmanna i jedna wiąże kofaktor, a druga substrat. Podobieństwa między domenami widoczne są na poziomie struktury fałdu raczej niż sekwencji aminokwasowej. Świadczy to prawdopodobnie o bardzo odległym w czasie wspólnym prekursorze motywu Rossmanna. Niemniej, ogólny motyw strukturalny dostał zachowany, jak też zdolność wiązania ligandów o charakterze nukleotydowym. Następnie mamy zmiany konformacyjne białka, na różnych poziomach, od których zależy aktywność enzymu. Porównanie pokrewnych SAHazy i różnych form krystalicznych, gdzie białko tworzy kompleksy z różnymi ligandami, pozwoliło habilitantowej zaobserwować enzym w konformacji otwartej oraz zamkniętej, jeżeli chodzi o aranżację domen, co decyduje o dostępności miejsc wiązania dla substratu i możliwości skutecznego oddziaływania elementów białka i kofaktora celem reakcji katalitycznej. Na bardziej detalicznym poziomie habilitant obserwował oddziaływania reszt aminokwasowych i zmiany strukturalne zależne od rodzaju ligandu. A więc nie sam fałd, ale zakonserwowane motywy sekwencji aminokwasowej determinują specyficzność oddziaływań z ligandem. Habilitant przeprowadza tę analizę zwracając uwagę na motywy

sekwencji tworzące sygnaturę wiązania określonych ligandów, a także pewne cechy wspólne, jakie występują w różnych miejscach wiązania ligandu dla części purynowej, pierścienia rybozy i reszt fosforanowych, o ile takie występują. Wykluczył przy tym możliwość jakoby SAHazy miały pełnić funkcję białek wiążących cytokininy, z uwagi na to, że podstawnik na atomie N6 puryny nie pasuje do kieszeni wiążącej. W swych rozważaniach habilitant uwzględnia nie tylko trzy homologi SAHazy, które badał, ale także fukozylotransferazę NodZ. W przypadku tego ostatniego enzymu habilitant jako pierwszy zbadał jego strukturę krystaliczną z substratem i produktem reakcji.

Innym aspektem badań strukturalnych habilitanta jest rola kationów metali w strukturze i funkcji SAHazy. Habilitant jako pierwszy zwrócił uwagę na obecność jonu metalu alkalicznego w pobliżu centrum aktywnego roślinnej SAHazy i wyjaśnił jego rolę w kontroli dostępu substratu do miejsca wiązania. Struktura pętli wiążącej kation pozostaje niezmienna w obecności jonów Na^+ , K^+ Rb^+ czy NH_4^+ , ale aktywność enzymatyczna jest optymalna w obecności K^+ , natomiast Rb^+ inhibuje aktywność, mimo że ma podobny promień jonowy. Aby to wyjaśnić habilitant oszacował dynamikę konformacyjną cząsteczki, między formą otwartą i zamkniętą, wykorzystując w tym celu spektroskopię NMR w obecności różnych kationów i stwierdził, że dla K^+ enzym oscyluje optymalnie dla cyklu katalitycznego. Jest to naprawdę ciekawy i znaczący wynik, który rzuca światło na rolę jonów metali w białkach, a w kontekście badań prowadzonych przez habilitanta wprowadza istotny wymiar dynamiki do statycznych struktur krystalograficznych. Habilitant wyjaśnił też, na bazie badań krystalograficznych, dlaczego jony cynku hamują aktywność katalityczną SAHazy.

Innym ciekawym aspektem badań SAHazy była analiza krystalograficzna białka z termofila. Okazało się, że termofilne białko otrzymane w temperaturze pokojowej jest nieprawidłowo sfaldowane i dopiero inkubacja enzymu w podwyższonej temperaturze doprowadziła do aktywnej konformacji. Jest to znaczący wynik w ogólnym kontekście badań białek termofilnych. Widać, że można otrzymać stabilną strukturę odpowiadającą lokalnemu raczej niż naturalnemu minimum energetycznemu, a otrzymanie formy krystalicznej białka nie oznacza, że jest to forma natywna.

Nie udało się wykrystalizować całego termofilnego białka PriB, które składa się z dwóch homologicznych domen połączonych prawdopodobnie elastycznym łącznikiem. Natomiast udało się otrzymać wysokorozdzielczą strukturę domeny N-terminalnej. Okazało się, że domeny te w sieci krystalicznej układają się w dimery i możliwe, że taki układ podobny jest do natywnej struktury podjednostki PriB pełnej długości. Struktura białka badanego przez habilitanta nie zawiera DNA, więc można tylko domniemywać na podstawie

porównań z homologiem z *E. coli*, jak takie oddziaływania wyglądają.

Struktura oligomeru Z-DNA jest osobnym rozdziałem, jeżeli chodzi o badania strukturalne. Związek z pozostałymi obiektami badań wymienionych w osiągnięciu habilitacyjnym jest tylko na poziomie chemicznej natury badanych obiektów. Niemniej przedstawiona struktura DNA jest interesująca i sporo wnosi do badań krystalograficznych w ogóle. Zwraca uwagę nadzwyczaj wysoka rozdzielczość danych dyfrakcyjnych, bardzo rzadko osiągalna w przypadku cząsteczek biologicznych. Dzięki temu można było udokładować model cząsteczki bez pomocy więzów stereochemicznych, a nawet można było zweryfikować standardowe parametry stosowane w udokładnianiu struktur krystalograficznych. Habilitant zauważył odstępstwa od wartości słownikowych i przypisał je do specyfiki formy Z DNA. We wniosku postuluje, moim zdaniem słusznie, aby w stosowaniu więzów stereochemicznych uwzględniać strukturalny kontekst danej cząsteczki.

Podsumowując, dobrze oceniam przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe. Wiodącym tematem badawczym habilitanta są badania strukturalne hydrolazy S-adenozylhomocysteiny, które dr Brzeziński rozwija od czasów swoich studiów doktoranckich i będzie mógł rozwijać dalej dzięki znacznym funduszom, jakie udało mu się uzyskać. SAHaza jest złożonym enzymem, który w badaniach strukturalnych ujawnia wiele interesujących aspektów o szerszym znaczeniu dla biologii strukturalnej, a sam enzym pełni istotną rolę w organizmach. Habilitant osiągnął wysoki poziom umiejętności niezbędny do prowadzenia wnikliwych samodzielnych badań, a otrzymane przez niego wyniki wnoszą wartościową wiedzę do badań strukturalnych, do enzymologii, a nawet do badań nad ewolucją.

Ocena dorobku naukowego.

Całościowy dorobek naukowy habilitanta jest obszerny i różnorodny. Oprócz publikacji przedłożonych jako dzieło habilitacyjne obejmuje on 24 prac opublikowanych w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR), z czego 20 po uzyskaniu doktoratu. Były one cytowane, wg *Web of Science*, 249 razy (225 bez autocytowań), a indeks Hirscha dla dorobku habilitanta wynosi 9. Ponadto habilitant jest autorem lub współautorem 23 struktur zdeponowanych w bazie danych PDB i 35 struktur małowcząsteczkowych zdeponowanych w bazie CCDC. Są to dobre statystyki dla kandydata do habilitacji.

Przegląd całego dorobku publikacyjnego habilitanta ukazuje, że oprócz sześciu prac przedstawionych jako osiągnięcie habilitacyjne, ma on na swoim koncie więcej publikacji należącej do tematyki zgłoszonej w osiągnięciu. SAHaze poświęcone są dodatkowe cztery

publikacje notowane w bazie JCR, a dwie inne publikacje odnoszą się do fukozylotransferazy NodZ. W większości z nich habilitant jest autorem wiodącym. Czasopisma, w jakich ukazały się te prace są niżej notowane niż te zgłoszone w osiągnięciu habilitacyjnym. Niemniej odnotowuję, że dorobek publikacyjny habilitanta w zgłoszonej tematyce wykracza poza zbiór tych sześciu publikacji, które wybrał do osiągnięcia habilitacyjnego. Większość (13) z pozostałych publikacji habilitanta dotyczy krystalografii małych cząsteczek. Pozostałych kilka prac dotyczy innych struktur białkowych.

Oprócz dorobku publikacyjnego habilitant brał czynny udział w krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Wygłosił pięć wykładów na zaproszenie, wszystkie na międzynarodowych konferencjach. Ponadto ma na koncie kilka wystąpień ustnych i wiele posterów. Należy, moim zdaniem, pozytywnie ocenić jego aktywność konferencyjną, a wykłady na zaproszenie świadczą, że jego dorobek naukowy spotyka się z uznaniem w międzynarodowym środowisku badaczy. Jego dorobek spotkał się też z wyróżnieniem w postaci Nagrody im. Jakuba Parnasa, przyznanej przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne w 2006 roku za najlepszą pracę doświadczalną z zakresu biochemii lub biologii molekularnej wykonaną na terenie Polski. W 2013 roku habilitant otrzymał Nagrodę Rektora Uniwersytetu Białostockiego za działalność naukową.

Habilitant jest współautorem ośmiu krajowych wniosków patentowych. Trzy z nich dotyczą SAHazy, a cztery fulerenów, co wynika ze współpracy habilitanta z lokalną grupą badawczą na Uniwersytecie w Białymstoku.

Habilitant był wykonawcą dwóch projektów badawczych (NCN i KBN), a następnie kierownikiem dwóch projektów NCN: OPUS i SONATA-BIS. Oba kierowane przez niego projekty grantowe dotyczą badań SAHazy, a niedawno rozpoczęty projekt SONATA-BIS jest dużym wyróżnieniem i bardzo znacznym wsparciem finansowym, które umożliwi mu utworzenie zespołu badawczego i rozwijanie swojego programu badań przez najbliższe lata.

Podsumowując dorobek naukowy habilitanta stwierdzam, że w pełni spełnia on wymagania stawiane habilitantom, zarówno w mojej ocenie merytorycznej, jak i pod kątem zdolności prowadzenia i rozwijania własnego programu badań.

Ocena dorobku dydaktycznego i organizacyjnego.

W ostatnich latach swojej kariery naukowej habilitant był pracownikiem Uniwersytetu Białostockiego i ma z tego tytułu pokaźny dorobek dydaktyczny, w tym cykle wykładów z biochemii, krystalografii i chemii medycznej, a także ćwiczenia, zajęcia laboratoryjne, konwersatoria i konsultacje dla studentów I i II stopnia. Ma też na koncie anglojęzyczne

wykłady na Politechnice Lwowskiej i na platformie e-learningowej BioInfoBank. Ponadto habilitant popularyzuje chemię dając wykłady popularnonaukowe i pokazy dla uczniów szkół średnich i podstawowych. Jako opiekun nad studentami kierował pracami w ramach czterech licencjatów i trzech magisteriów. Jest opiekunem naukowym i promotorem pomocniczym jednego doktoratu. Bywa recenzentem artykułów przesłanych do *Acta Cryst. D*, *Organic Letters*, *Molecules* i *Journal of Chemical Chemistry*. Do działalności organizacyjnej habilitanta należy też zaliczyć uczestnictwo w komitetach organizacyjnych konferencji międzynarodowych, ogólnopolskich oraz letnich szkół pod patronatem Uniwersytetu Białostockiego. Habilitant współpracuje naukowo zarówno w kraju, jak i zagranicą. Jest też członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i *European Crystallographic Association*. Stwierdzam, że habilitant wykazuje aktywność dydaktyczną i organizacyjną na dobrym poziomie, a jego kontakty naukowe i sukcesy w zdobywaniu grantów dobrze rokują jego dalszej karierze.

Podsumowując stwierdzam, że dr Krzysztof Brzeziński jest dobrym kandydatem do habilitacji. Jego wniosek uważam za uzasadniony zarówno pod względem wniesionego wkładu w rozwój uprawianej przez niej dyscypliny naukowej jak i istotnej aktywności naukowej. Przedstawiony dorobek niewątpliwie spełnia wymagania stawiane przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku i późniejsze akty prawne. Jest to dorobek dobrze udokumentowany często cytowanymi publikacjami w renomowanych czasopismach naukowych. Zatem z pełnym przekonaniem popieram wniosek dr. Krzysztofa Brzezińskiego o nadanie mu stopnia doktora habilitowanego.

Wojciech Gryniewski

Poznań, 2 grudnia 2019 r.