

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

Poznań, 30 kwietnia 2019 r.

**Recenzja osiągnięcia habilitacyjnego oraz całokształtu dorobku naukowego,
dydaktycznego i organizacyjnego dr. Szymona Krzywdy**

Sylwetka naukowa habilitanta. Dr Szymon Krzywda jest absolwentem Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W 1991 roku uzyskał tam tytuł zawodowy magistra biologii. W 1998 roku obronił na Wydziale Chemii UAM rozprawę doktorską pt. „Badania krystalograficzne mutantów mioglobiny z *Sus domesticus*”, którą wykonał pod kierunkiem promotorskim prof. Mariusza Jaskólskiego. Od tego czasu pracuje jako adiunkt na Wydziale Chemii UAM, z kilkuletnią przerwą na początku lat 2000. na staż podoktorski, który odbył na Uniwersytecie w Yorku.

Ocena osiągnięcia habilitacyjnego. Dorobek habilitanta przedstawiony jest w obszernym autoreferacie. Przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe składa się z ośmiu publikacji, które ukazały się w latach 2000-2014. Wszystkie z nich to prace opublikowane w dobrych bądź bardzo dobrych międzynarodowych czasopismach notowanych w *Journal Citation Reports* (JCR). Publikacje te były dotychczas cytowane ponad 400 razy. W trzech z nich habilitant jest autorem wiodącym, a w jednej jest autorem korespondencyjnym. Przedstawiony zbiór opatrzony jest tytułem „Wysokorozdzielcze rentgenograficzne struktury peptydaz i ich inhibitorów”. Pierwsze dwie prace poświęcone są badaniom struktury zmutowanego inhibitora trypsyny BPTI. Pierwsza publikacja opisuje strukturę, dla której wykonano pomiary dyfrakcyjne w temperaturze pokojowej, z rozdzielczością 1,4 Å, a druga praca przedstawia analizę tej struktury w temperaturze 100K, z rozdzielczością 0,86 Å. Badania te są znaczące z kilku powodów. Polipeptydowe inhibitory proteaz nie różnią się chemicznie od substratów, jednak nie ulegają proteolizie lub ulegają jej bardzo powoli. Źródło ich stabilności dociekano przez badania strukturalne i mutagenezę. Publikacje H1 i H2 niniejszego osiągnięcia habilitacyjnego przedstawiają właśnie takie szczegółowe badanie struktury mutantu. Pierwszą z prac udało się opublikować w renomowanym i wysoko notowanym

czasopiśmie *Journal of Molecular Biology*. Innym istotnym aspektem badań jest ultrawysoka rozdzielczość z jaką udało się opisać tę strukturę w drugiej publikacji. Do końca lat 80. struktury białek poznawano z rozdzielczością o wiele niższą niż w przypadku małych cząsteczek i uznawano to za normę. Jednak zastosowanie promieniowania synchrotronowego umożliwiło pomiary wysokorozdzielcze również dla białek i innych makrocząsteczek biologicznych i okazało się, że niektóre z nich rzeczywiście rozpraszają promienie Rentgena z rozdzielczością atomową, tzn. około 1 Å. Nieliczne takie początkowo przypadki pozwoliły na zrewidowanie dotychczasowych wzorców stereochemicznych stosowanych w modelowaniu struktur białkowych. Osiągnięta tu rozdzielczość 0,86 Å przekracza przyjęty wówczas zakres rozdzielczości atomowej dla białek i w pełni dorównuje poziomowi osiąganemu w analizie małych cząsteczek. W modelowaniu struktury z taką rozdzielczością można w procesie udokładniania modelu nie stosować więzów dla większości modelowanej cząsteczki. Nieliczne wówczas ultrarozdzielcze struktury, jak ta z publikacji H2, posłużyły do przetestowania w jaki sposób można użyć algorytmów dotychczas stosowanych dla małych cząsteczek do udokładniania struktur białkowych. Okazało się wówczas, że dotychczasowe standardy stereochemii białek należy zrewidować. Diagram Ramachandrana uległ modyfikacji, a stosowane dotąd więzy okazały się nazbyt restrykcyjne. Na przykład atomy wokół wiązania peptydowego odbiegają w białkach od płaszczyzny nawet o 20° (odchylenie standardowe to blisko 10°), a nawet średnia wartość dla kąta ω nie wynosi 180°, ale około 179°. Zauważa to habilitant w swojej pracy. Chcę przy tym zauważyć, że mimo opublikowanej kolejności autorów, to habilitant zdaje się być głównym autorem tej pracy.

Dwie kolejne publikacje, H3 i H4, opisują prace wykonane przez habilitanta w czasie jego pobytu na Uniwersytecie w Yorku. Zbadał on wówczas strukturę proteiny FtsH z *E. coli*. Enzym ten degraduje nieprawidłowo sfałdowane białka membranowe oraz niektóre białka cytoplazmatyczne. Zbadana struktura pozwoliła pośrednio zlokalizować miejsce wiązania nukleotydu w tym enzymie zależnym od ATP, jako że jon siarczanowy związał się w kieszeni wiążącej nukleotyd, w miejscu odpowiadającym wiązaniu fosforanu β . Białko w kryształach tworzy dimery, które prawdopodobnie nie mają znaczenia fizjologicznego, ale autorzy, w oparciu o strukturę krystalograficzną, wymodelowali heksamery o topologii podobnej do obrazów z mikroskopii elektronowej i sformułowali szereg propozycji co do natywnej struktury i funkcji tego białka. W obu publikacjach habilitant jest autorem wiodącym.

Kolejne dwie publikacje poświęcone są proteinazie z retrowirusa pokrewnego HIV, infekującego małpy. Długo nie udawało się rozwiązać tej struktury mimo podobieństwa

sekwencji aminokwasowej do zbadanej wcześniej proteiny z HIV. Przełom nastąpił, gdy problemem zajęli się gracze komputerowi, którzy w wielkoskalowym projekcie skonstruowali model struktury tego białka, który był dostatecznie podobny do struktury rzeczywistej. Udało się dzięki temu zastosować metodę podstawienia cząsteczkowego do rozwiązania struktury krystalograficznej. Największy kredyt należy się graczom, niemniej warto odnotować wkład habilitanta w ten fascynujący i unikalny projekt, który zaowocował dużym zainteresowaniem mediów i publikacją w *Nature Structural & Molecular Biology*. Druga z publikacji jest czysto krystalograficzna i przedstawia analizę struktury i porównanie z pokrewnymi enzymami wirusowymi. Zbadana struktura jest pierwszą poznaną formą monomeryczną enzymu z tej rodziny.

Ostatnie dwie publikacje, H7 i H8, opisują wysokorozdzielcze struktury zawierające inhibitory enzymów proteolitycznych. W pierwszej publikacji habilitant jest autorem wiodącym, w drugiej korespondującym. W H7 badany jest kompleks zmodyfikowanego inhibitora SFTI z trypsyną. Inhibitor zmodyfikowany jest w taki sposób, że w jednej z reszt aminokwasowych łańcuch boczny przyłączony jest do atomu azotu z wiązania peptydowego zamiast do atomu węgla alfa. W zbadanej strukturze zmodyfikowany inhibitor związał się enzymem podobnie jak inhibitor naturalny. Struktura kompleksu wyjaśnia rolę Ser241 trypsyny w wiązaniu substratu i, pośrednio, jego hydrolizie. Ostatnia struktura, jest kolejną strukturą określoną z rozdzielczością atomową, najwyższą dla inhibitora z rodziny Kazala. Białko zostało otrzymane po odcięciu metki histydynowej metodą nie wymagającą proteazy.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożone do oceny osiągnięcie naukowe jest obszerne, obejmuje badania strukturalne różnych białek, które łączy, oprócz podejścia metodologicznego to, że są to białka proteolityczne lub ich peptydowe inhibitory. Niektóre z tych struktur zostały określone i przeanalizowane z wysoką bądź bardzo wysoką rozdzielczością, co nadaje tym badaniom dodatkowy wymiar. Osiągnięte wyniki wnoszą znaczący wkład w rozwój badań biostrukturalnych i w pełni upoważniają habilitanta do wystąpienia o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

Ocena dorobku naukowego.

Całościowy dorobek naukowy habilitanta obejmuje 24 prace opublikowane w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* (JCR). Były one cytowane, wg *Web of Science*, ponad 900 razy, a indeks Hirscha dla dorobku habilitanta wynosi 13. Ponadto habilitant jest autorem lub współautorem 27 krystalograficznych modeli struktur białkowych zdeponowanych w bazie danych PDB. To są bardzo dobre statystyki dla kandydata do habilitacji.

Oprócz prac przedstawionych jako dzieło habilitacyjne habilitant ma w dorobku kilkanaście innych publikacji w notowanych międzynarodowych czasopismach. Oprócz serii prac poświęconych mioglobinie, które były wykorzystane do doktoratu, na uwagę zasługuje cykl publikacji poświęconych badaniom strukturalnym cytochromu c6 z sinicy *Synechococcus*. Struktury te też zostały zbadane z rozdzielczością atomową, a celem badań było określenie zależności między strukturą a potencjałem redoks. Habilitant miał też udział w badaniach gankyriny, produktu onkogenu, składnika regulatorowej części proteasomu. Zatem jest to też w jakiejś mierze badanie związane z proteolizą.

Oprócz owych 24 publikacji, które ukazały się w czasopismach z listy JCR habilitant jest współautorem kilku innych anglojęzycznych publikacji oraz wygłosił kilka referatów na konferencjach międzynarodowych i krajowych. Jest też współautorem kilkunastu komunikatów konferencyjnych. Habilitant był kierownikiem dwóch projektów grantowych (KBN i MNiSW), głównym wykonawcą w jednym i wykonawcą w trzech innych. Podsumowując jego dorobek naukowy stwierdzam, że habilitant z nawiązką przekracza wymagania stawiane habilitantom – zarówno w mojej ocenie merytorycznej, jak „sientometrycznej”.

Ocena dorobku dydaktycznego i organizacyjnego.

Habilitant wygłosił kilka cykli wykładów przedmiotowych w języku polskim bądź angielskim na temat biologii strukturalnej dla studentów wydziałów Biologii oraz Chemii UAM, w tym też dla studentów międzynarodowego kierunku prowadzonego na Wydziale Chemii. Opracował wspólnie z kolegami kilka programów ćwiczeń dla studentów swojego wydziału, dla Wydziału Biologii a także dla międzywydziałowego, międzyuczelnianego kierunku Bioinformatyka oraz dla studentów kierunku międzynarodowego. Ponadto przeprowadził kilka zajęć i ćwiczeń dla uczniów szkół średnich w Poznaniu. Opiekował się magistrantami w Poznaniu i podczas swego pobytu na Uniwersytecie w Yorku. Zrecenzował kilka artykułów dla czasopism międzynarodowych. Można więc powiedzieć, że habilitant, na obecnym etapie kariery naukowej, wykazuje dobrą aktywność nauczyciela akademickiego i popularyzatora nauki.

Podsumowując stwierdzam, że dr Szymon Krzywda jest dobrym kandydatem do habilitacji. Jego wniosek uważam za w pełni uzasadniony zarówno pod względem wniesionego wkładu w rozwój uprawianej przez niego dyscypliny naukowej jak i istotnej aktywności naukowej. Przedstawione osiągnięcia habilitacyjne jak i cały dorobek

niewątpliwie spełniają wszelkie wymagania stawiane przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 roku, z późniejszymi zmianami. Dr Krzywda jest doświadczonym krystalografem i nauczycielem akademickim. Jego dorobek mógłby być przedłożony do habilitacji już kilka lat wcześniej. Jest to dorobek znaczący i dobrze udokumentowany często cytowanymi publikacjami w renomowanych czasopismach naukowych. Zatem z pełnym przekonaniem popieram wniosek dr. Szymona Krzywdy o nadanie mu stopnia doktora habilitowanego.

Wojciech Rymuś

