



Prof. dr hab. Agnieszka Chacińska
Laboratorium Biogenezy Mitochondriów
IMol Polska Akademia Nauk

Warszawa, 13.06.2023

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pana mgr Marcina Jelenia

**„Charakterystyka oddziaływania mitochondrialnego system białek
opiekuńczych Ssq1/Hsc20 z białkiem Isu1 uczestniczącym w biogenezie centrów
żelazowo-siarkowych”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Rafała Dutkiewicza, prof. UG

z Zakładu Biochemii Ewolucyjnej

Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Białka opiekuńcze stanowią liczącą klasę białek, zaangażowanych w całą plejadę procesów komórkowych o kluczowym znaczeniu dla fizjologii komórek i całych organizmów. W kontekście ich fundamentalnego znaczenia dla organizmów żywych istotne jest poznanie funkcji, dynamiki i architektury kompleksów białek opiekuńczych na poziomie molekularnym. Ciekawej wiedzy, także o znaczeniu uniwersalnym, dostarczają prace na systemach modelowych. Doktorant mgr Marcin Jeleń podjął się zadania poznania dynamiki kompleksu Hsp70, białka typu J a także ich substratu, białka Isu1. Białko Isu1 stanowi rusztowanie do syntezy centrów żelazowo-siarkowych (FeS) w mitochondriach, a oba wymienione białka opiekuńcze Ssq1 (Hsp70) i Hsc20 (białko typu J) należą do znanych i uniwersalnych rodzin białek opiekuńczych, zaangażowanych w homeostazę białek, w szczególności ich zmiany konformacyjne zachodzące przy fałdowaniu w i w trakcie transportu, pełniąc ważną rolę w rozliczne procesy komórkowe. Poznanie mechanizmu działania białek opiekuńczych jest więc ważną dziedziną, w której wraz z rozwojem zaawansowanych technologii i koncepcji następuje znaczący postęp. W tę tematykę wpisują się badania in vitro przeprowadzone przez Marcina



Jelenia, a dotyczące potrójnego kompleksu Ssq1/Hsc20/Isu1, z udziałem oczyszczonych białek pochodzących z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Badania te są opisane w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej.

Formalny opis rozprawy oraz ocena strony edytorskiej

Podstawą rozprawy doktorskiej są opisy i wyniki eksperymentów, które tworzą spójną całość, i są materiałem na dobrą publikację/publikacje. Rozprawa rozpoczyna się streszczeniami w językach polskim i angielskim. Dość obszerny wstęp rozprawy przedstawia obecną wiedzę na temat roli oraz syntezy centrów żelazowo siarkowych, w tym różnych strategii stosowanych przez organizmy żywe, poszczególnych etapów, oraz głównych enzymów, które biorą udział w tym procesie. Doktorant przedstawia więcej szczegółów w przypadku procesu syntezy w mitochondriach, oraz roli białek opiekuńczych w tym procesie. Wstęp zamyka fragment dotyczący patologii i chorób powiązanych z tym niezmiernie istotnym procesem biochemicznym.

Po sprecyzowaniu celu pracy następuje opis materiałów i metod, które sprawia wrażenie bardzo solidnego i wyczerpującego. Niewątpliwie ważną dla pracy, a także powtarzalności wyników przez innych eksperymentatorów są metody oczyszczania poszczególnych białek oraz ich wariantów zmutowanych, wiązanie ich w kompleksy oraz zaawansowanych oznaczenia biochemiczne i biofizyczne, w tym tych oparte na spektrometrii mas, mające na celu ocenę dynamikę i stabilność interakcji. Rozdział zawierający opis wyników opatrzony jest wieloma rycinami o wysokiej jakości. Rozdział poświęcony dyskusji wyników jest bardzo obszerny. Czytając ten rozdział miałam problemy w uchwyceniu najważniejszych wniosków wpływających z pracy eksperymentalnej- tę krytykę rozwinę bardziej szczegółowo w dalszej części tekstu recenzji. Literatura jest zacytowana właściwie, i zawiera zarówno klasykę jak i nowe prace.

Rozprawa napisana jest w sposób raczej szczegółowy, a wręcz momentami drobiazgowy, co czasami wpływa na jej przejrzystość i czytelność. Poza rycinami przedstawiającymi wyniki, wstęp oraz dyskusja opatrzona są ilustracjami, które pomagają zrozumieć główne założenia,



oraz tezy pracy. Rozprawa przygotowana jest starannie i nie zawiera zbyt wielu błędów edytorskich. Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona mi rozprawa doktorska jest w pełni satysfakcjonująca i pozwala na zapoznanie się i ocenę dokonań kandydata do stopnia doktora nauk biologicznych.

Ocena merytoryczna

Głównym celem jaki postawił sobie doktorant Marcin Jeleń było zbadanie tworzenia się kompleksu dwóch białek opiekuńczych Ssq1 i Hsc20 z ich substratem Isu1. Aby utworzenie kompleksu potrójnego było stabilne, do badań został użyty wariant Ssq1 pozbawiony aktywności hydrolitycznej ATP. Wszystkie białka są pochodzenia mitochondrialnego z drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorant oczyścił najpierw powyższe białka do stanu bliskiego homogenności i w stanie aktywnym, używając systemów do ekspresji bakteryjnej i te białka zostały użyte do serii eksperymentów w celu opisanie interakcji na poziomie biochemicznym i biofizycznym. Przeprowadzone również metagenezę i wygenerowano wiele wariantów wyżej wymienionych białek, gdzie aminokwasy kluczowe dla binarnych interakcji (pokazane w literaturze lub wytypowane w obecnej pracy na podstawie wymiany deuterowej połączonej ze spektrometrią mas) podstawiono. W pracy zastosowane zostały klasyczne i nowoczesne metody biochemiczne. Wykazano, że reszty aminokwasowe kluczowe dla utworzenia i stabilności bilateralnych kompleksów odgrywają niemniej istotną rolę w kompleksie potrójnym. Zidentyfikowano także szereg nowych miejsc w białkach, które są istotne do interakcji i utworzenia kompleksu potrójnego. Eksperymentalnie praca jest bogata. Przedstawienie eksperymentów nie pozostawia nic do życzenia. Tematyka wpisuje się w mechanistyczne badania, bez których poznanie zależności przyczynowo skutkowych w procesach na poziomie molekularnym jest niemożliwe.

Oceniając wyniki pracy, dochodzę do wniosku, że mają one największe znaczenie dla środowiska uczonych zainteresowanych mechanizmami akcji białek opiekuńczych. Czy Doktorant się ze mną zgadza? Kontekst białek opiekuńczych nie został wystarczająco przedstawiony w pracy, ale łatwo można to „naprawić” w czasie obrony pracy doktorskiej. Doktorant nie w pełni poradził sobie z syntetycznym ujęciem wyników pracy oraz ich znaczenia w szerszym kontekście. Szczegółowa dyskusja nie ułatwia zadania czytelnikowi.



Czy zostały zidentyfikowane miejsca czy mechanizmy wiązań, unikalne dla kompleksu potrójnego? Czy nowo zidentyfikowane reszty aminokwasowe jako ważne dla kompleksu potrójnego są także ważne dla interakcji „bilateralnych”?

Poza krytyką, którą przedstawiłam powyżej, a która mam nadzieję doprowadzi do ciekawej dyskusji, chciałabym poruszyć jeszcze następujące sprawy, które moim zdaniem nie zostały wystarczająco jasno przedstawione, a do których mam nadzieję doktorant ustosunkuje się w czasie obrony w sposób syntetyczny:

- 1) Czy przedstawione wyniki badań są ważne tylko z perspektywy tworzenia się centrów FeS, czy także dla poszerzenia wiedzy na temat mechanizmu działania chaperonów z rodziny Hsp70 oraz białek typu J?
- 2) Jakie konsekwencje fizjologiczne i/lub ewolucyjne mają wyniki badań Doktoranta? Dlaczego ta tematyka jest tak ważna?
- 3) Jaka jest perspektywa dalszych badań, w szczególności w aspekcie całej komórki

Podsumowując, wyniki zebrane, opisane i zinterpretowane przez Doktoranta, p. Marcina Jelenia prezentują znaczącą wartość poznawczą, dostarczając ciekawych interpretacji dot. kinetyki działania białek opiekuńczych i ich interakcji z substratami. Jestem też przekonana, że będą opublikowane i docenione przez społeczność naukową. Przedstawionej powyżej uwagi są zdeterminowane chęcią poszerzenia dyskusji i nie mają wpływu na moją bardzo pozytywną ocenę naukowej wartości pracy. Zarówno wartość merytoryczną rozprawy, jak i kompetencje doktoranta oceniam bardzo wysoko.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska p. Marcina Jelenia to dogłębna analiza biochemiczna interakcji trzech białek, oraz ich wariantów z zmianami w sekwencji kluczowych aminokwasów, w układzie in vitro, po oczyszczeniu i z użyciem klasycznych i nowoczesnych metod badania dynamiki kompleksów białkowych. Zaawansowane techniki oparte na spektrometrii mas były prowadzone we współpracy ze specjalistami. Analiza ta dostarczyła wartościowych danych dotyczących podstaw stabilności kompleksu mitochondrialnych białek opiekuńczych Ssq1 orz Hsc20 z ich substratem Isu1.



Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Ponadto dorobek naukowy kandydata, zarówno wyniki przedstawione w rozprawie, jak i udział w opublikowanych już pracach, uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemii. W związku z powyższym, wnoszę do rady naukowej dyscypliny nauk biologicznych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie pracy i dopuszczenie pana mgr Marcina Jelenia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Agnieszka Chacińska