



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Wydział Biologii
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Poznań, 6.06.2023

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr. Marcina Jelenia pt.

„Charakterystyka oddziaływania mitochondrialnego systemu białek opiekuńczych Ssq1/Hsc20 z białkiem Isu1 uczestniczącym w biogenezie centrów żelazo-siarkowych”

Oceniana praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr hab. Rafała Dutkiewicza, prof. UG, którego zespół z powodzeniem zajmuje się badaniem kluczowych etapów mitochondrialnej biogenezy centrów żelazo-siarkowych (FeS). Białka zawierające centra FeS pełnią istotną rolę w przekazywaniu elektronów, regulacji redoks, syntezie metabolitów czy biogenezie rybosomów. Formowanie i montaż centrów FeS w mitochondriach to złożony proces angażujący wyspecjalizowane białka tworzące kompleksy, w których specyficzne interakcje pomiędzy tymi białkami warunkują aktywność biologiczną.

Głównym tematem badawczym mgr. Marcina Jelenia była analiza strukturalna i funkcjonalna kompleksu mitochondrialnych białek opiekuńczych Ssq1 (białko Hsp70) i Hsc20 (białko zawierające domenę J) z białkiem Isu1, będącym molekularnym rusztowaniem niezbędnym do biosyntezy centrów FeS. Do badań wybrano zatem dogodny model badawczy mitochondrialnej biogenezy centrów FeS drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Warunkiem wstępnym analizy strukturalnej było uzyskanie preparatów białkowych ze stabilnym potrójnym kompleksem składającym się z Ssq1:Hsc20:Isu1. Doktorant oczyścił taki kompleks ze szczepu bakterii *Escherichia coli*, w którym przeprowadził jednoczesną nadprodukcję białek Isu1, Hsc20 i Ssq1 z mutacją T239A, która uniemożliwiała hydrolizę ATP. Otrzymany potrójny kompleks białkowy posłużył do identyfikacji reszt aminokwasowych zaangażowanych w oddziaływanie między białkami kompleksu przy użyciu techniki pomiaru stopnia wymiany wodoru na deuter połączonej ze spektrometrią mas (HDX-MS). Na podstawie analizy bioinformatycznej wyników uzyskanych z doświadczeń HDX-MS przygotowano mutanty z substytucjami alaninowymi wytypowanych, wcześniej znanych z literatury i kilku zidentyfikowanych w tych badaniach, kluczowych reszt aminokwasowych. Następnie Doktorant oczyścił zmutowane wersje białek i badał je pod kątem wydajności tworzenia potrójnego kompleksu w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych. Uzyskane wyniki potwierdziły dotychczas znane interakcje oraz pozwoliły na identyfikację nowych miejsc oddziaływania istotnych dla formowania kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1. Trzeba podkreślić, że badania opisane w pracy doktorskiej mgr. Marcina Jelenia są ważne z punktu widzenia poznawczego oraz - w dalszej perspektywie - aplikacyjnego, gdyż zaburzenie biogenezy FeS u człowieka jest przyczyną wielu chorób.

Formalny opis rozprawy

Praca przedstawiona do recenzji napisana jest ładnym, zwięzłym i jasnym językiem, zawiera, co należy podkreślić, ładną oprawę graficzną. W całej pracy można znaleźć literówki i drobne błędy stylistyczne, które nie będą przytaczać.

Praca jest dość obszerna, obejmuje 143 strony i zawiera 65 rycin. Układ pracy jest typowy i obejmuje: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy,

materiały i metody, wyniki, dyskusję oraz - liczącą około 130 pozycji - bibliografię, w większości złożoną z pozycji literaturowych opublikowanych w ostatnich 10 latach.

Uwagi:

- W pracy występują pewne błędy redakcyjne, takie jak: niejednolity zapis pozycji literaturowych (tytułów artykułów), ich niealfabetyczna kolejność utrudniająca odnalezienie poszczególnych publikacji a także cytowania pojawiające się w tekście często na końcu akapitu zamiast po pierwszym zdaniu, którego dotyczą. W Wynikach i Dyskusji można znaleźć fragmenty bez przypisanych źródeł literaturowych. W Spisie treści pomocne byłoby umieszczenie stron lokalizujących poszczególne części rozprawy.
- W całym tekście Autor nie stosuje spacji między wartością liczbową a literowym oznaczeniem miary (np. „+300mV”, „2,5µM”, „1300kDa”, czy „9ml”). Spacji nie należy umieszczać jedynie przed °C czy %.

Muszę podkreślić, że wszystkie te niedociągnięcia, o których wspominam z obowiązku recenzenta, nie są istotne, biorąc pod uwagę dużą wartość merytoryczną ocenianej pracy doktorskiej.

Merytoryczna ocena rozprawy

Poprzedzający część doświadczalną, liczący 23 strony Wstęp stanowi ciekawie napisany przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat struktury i roli centrów FeS oraz bakteryjnych i mitochondrialnych (na przykładzie drożdży *S. cerevisiae*) systemów biogenezy centrów FeS. Doktorant omówił także najważniejsze zagadnienia dotyczące białek opiekuńczych systemu Hsp70 zaangażowanych w formowanie, montaż i stabilizację centrów FeS, białka biorące udział w późnych etapach tego procesu oraz rolę centrów FeS w patogenie. Lektura tego rozdziału przekonuje o dużej wiedzy Doktoranta i znajomości najważniejszych pozycji literaturowych dotyczących omawianych zagadnień.

Uwagi:

- W mitochondriach do syntezy centrów FeS ale także hemów potrzebne jest żelazo. Proszę krótko opisać w jaki sposób żelazo jest transportowane do mitochondriów i tam magazynowane.
- W Ryc. 10 obrazującej ewolucję białek zaangażowanych w biogenezę FeS zabrakło mi umieszczenia roślinnego białka mtHsp70.

Rozdział Materiały (5 stron) zawiera staranny opis użytych w pracy szczepów bakteryjnych i wektorów plazmidowych. W rozdziale Metody (12 stron) znajdują się obszernie opisy stosowanych metod badawczych, w tym - zaadoptowane do specyfiki danego białka lub kompleksu białek – techniki ich izolacji i oczyszczania, elektroforeza w warunkach denaturujących i natywnych, precypitacja kompleksów białkowych, pomiar aktywności ATPazowej czy dichroizm kołowy. Uwagę zwraca duża różnorodność stosowanych technik, świadcząca o wszechstronności Doktoranta w pracy doświadczalnej. Na końcu rozdziału Metody Doktorant opisał techniki i metody (takie jak wymiana deuterowa ze spektrometrią mas, analiza bioinformatyczna, spektrometria masowa natywna i po rozdziale w warunkach denaturujących) wykorzystane przez inne osoby do analiz uzupełniających badania wykonane przez autora rozprawy.

- Rozumiem, że duża część przeprowadzonych badań ma charakter ilościowy. Jednak analiza wydajności tworzenia kompleksów w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych czy inne pomiary ilościowe wykonywane w kilku powtórzeniach powinny być zanalizowane pod względem istotności statystycznej. Dlatego brakuje mi punktu Analiza statystyczna i opisanie, które badania miały powtórzenia biologiczne i techniczne.

W najobszerniejszym rozdziale Wyniki, który obejmuje 57 stron, Autor szczegółowo opisuje wyniki przeprowadzonych badań zgrupowanych w 8 głównych punktów. Na podkreślenie zasługuje sposób prowadzenia czytelnika przez liczne i złożone etapy pracy eksperymentalnej oraz wyjaśnianie poszczególnych kroków. Doceniam szczegółowe ale jasno napisane wstępy do poszczególnych punktów, które wprowadzają czytelnika w dany problem badawczy a także dyskusję otrzymanych wyników już na tym etapie. Wyniki prezentowane są w logicznej kolejności i tworzą spójną całość. Trzeba podkreślić, że Doktorant umiejętnie, zachowując krytycyzm, analizował i interpretował wyniki, których opis w poszczególnych punktach kończył krótkim podsumowaniem, porządkując tym samym kolejne etapy badawcze.

W pierwszej części Wyników (Rozdział 4.1.) Doktorant opisał przeprowadzone wieloetapowe oczyszczanie białek Ssq1 (WT i mutantka Ssq1^{T239/A}), Hsc20 oraz Isu1 (ze znacznikami Isu1-His i Isu1-GST) z wykorzystaniem różnych źródeł, znaczników czy technik filtracji żelowej. Strukturę otrzymanych preparatów białkowych oceniał przy użyciu spektrometru dichroizmu kołowego a wydajność poszczególnych procedur - z wykorzystaniem analizy densytometrycznej.

- Czy w przeprowadzonych analizach oceniano ilościowo stopień oczyszczenia danego białka uwzględniając całkowitą ilość białka w preparacie?

W Rozdziale 4.2. Doktorant wykazał, że treonina T239 pełni kluczową rolę w aktywności ATPazowej białka Hsp70. Wykorzystanie białka Ssq1 z mutacją T239/A pozwoliło na uzyskanie kompleksu trzech białek obejmującego białko Hsp70 (Ssq1), białko zawierające domenę J (Hsc20) oraz substrat (białko Isu1) i będącego efektem stabilizacji oddziaływań w obecności Hsc20.

Uwagi:

- Strona 56. Autor pisze, że mierzył aktywność ATPazy w warunkach równowagi nie precyzując, że ma na myśli zapewne równowagę allosteryczną między stanami konformacyjnymi Hsp70. Jak wyznaczono warunki stanu równowagi? W pomiarach enzymatycznych stan równowagi oznacza warunki, w których nie zmienia się już stężenie substratu i produktu.

- Strona 57. W przeprowadzonej analizie użyto „równomolowe ilości” białek pomocniczych Hsc20 i Mge1 oraz Ssq1. Czy znana jest stechiometria tych białek w kompleksie?

- Ryc. 27B, 27C i wszystkie następne densytometryczne analizy ilości badanych białek z wykresami słupkowymi. Doktorant powinien zaznaczyć że, jako 1 przyjęto wartość sygnału reprezentującą ilość białka Ssq1 związanego w badanym kompleksie w jednym z trzech pomiarów. Sugeruje to wartość referencyjna (1) przedstawiona z odchyleniem standardowym. Interpretację wyników, zwłaszcza przy mniejszych zmianach, ułatwiłaby analiza istotności statystycznej.

W Rozdziale 4.3 Doktorant wykazał, że spośród różnych wersji ekspresji w bakteryjnym systemie ekspresyjnym, najbardziej wydajna procedura oczyszczania potrójnego kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 wymaga jednoczesnej nadekspresji jego składników w postaci Ssq1^{T239/A}-His, Hsc20 oraz Isu1-His. Stosunek ilości potrójnego kompleksu (Ssq1:Hsc20:Isu1) do podwójnego kompleksu (Hsc20:Isu1) był rzeczywiście największy w tym podejściu (Ryc. 36A).

Uwagi:

- Czy porównano stopień czystości preparatów otrzymanych w różnych podejściach?

- Elektroforeza natywna potrójnego kompleksu (Ryc. 39) pokazała, że dominującym prążkiem na żelu jest prążek, jak pisze Doktorant, „odpowiadający masie około 139 kDa, a więc masie kompleksu, w którym obecne są wszystkie trzy białka Ssq1, Hsc20 oraz Isu1”. Natywna spektrometria masowa potrójnego kompleksu (Ryc. 40) wykazała obecność heterotrimeru o masie 107 kDa oraz heksameru o masie 215 kDa. Jak wyjaśnić różnice w masie heterotrimeru i obecność dodatkowych prążków po rozdiale elektroforetycznym w warunkach natywnych?

Wykonane przez Doktoranta doświadczenie typu precypitacja kompleksów białkowych, z wykorzystaniem zmutowanego białko fuzyjnego Isu1^{P134,V135,K136/AAA}_GST (Rozdział 4.5) potwierdziło wcześniejsze badania wskazujące, że motyw PVK w obrębie substratu Isu1 determinuje wiązanie przez białko opiekuńcze Ssq1.

Następnie Doktorant wykazał, że hydrofobowe reszty aminokwasowe L105, L109, Y163 w obrębie białka Hsc20, wytypowane przez pomiar wymiany deuterowej HDX-MS, są zaangażowane w interakcję z substratem Isu1 (Rozdział 4.6).

- Strona 88. Skąd wiadomo, że w zastosowanych warunkach doświadczalnych stężenie 2,5 μ M Hsc20 jest wysycające?

Badając sieć interakcji kluczowych dla oddziaływania białka Hsc20 z białkiem Ssq1, z użyciem pojedynczych, podwójnych i potrójnych mutacji białka Hsc20 (Rozdział 4.7), Doktorant potwierdził, że motyw HPD pętli w domenie J jest istotny w tym oddziaływaniu, podobnie jak wskazane przez doświadczenia HDX-MS reszty R38, K38, R41 i K70 znajdujące się w obrębie helis H2 i H3 domeny J oraz wskazane przez model strukturalny reszty K12 i K172 domeny C-terminalnej.

- Ryc. 53B. Mutacja K38/A w obrębie Hsc20 powodowała spadek ilości Ssq1 w kompleksie potrójnym o ~71%. Patrząc na wykres słupkowy mam wątpliwości czy zmiana ta, mimo dużej wartości, jest istotna statystycznie. Analiza statystyczna mogłaby być pomocna także w interpretacji wyników Ryc. 54B.

- Ryc. 54 i Ryc. 58. W obu podobnych doświadczeniach, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała białko Hsc20 z pojedynczą mutacją Hsc20^{K132/A} uzyskano różne ilości Ssq1 w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1, tj. 58% (Ryc. 54) i 73% (Ryc. 58) w odniesieniu do kontroli pozytywnej. Skąd te różnice między seriami doświadczeń?

W ostatnim punkcie Wyników (Rozdział 4.8) Doktorant wykazał, że w obrębie białka Ssq1 reszta aminokwasowa R450 oddziałuje z resztą D362 i interakcja ta jest kluczowa dla formowania się kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1.

Obszerny, liczący 30 stron rozdział Dyskusja w zasadzie wyczerpuje aspekty wynikające z wyników własnych na tle w pełni wykorzystanych wyników innych badaczy. Lektura tego rozdziału, podobnie jak Wstępu, świadczy o dużej wiedzy Autora i swobodnym poruszaniu się w literaturze związanej z (i) funkcjonalnym oddziaływaniem systemu białek opiekuńczych Hsp70/J z substratem białkowym, (ii) strukturalnymi czynnikami determinującymi funkcjonalne oddziaływanie białka Hsc20 zawierającego domenę J z białkiem Ssq1 należącym do rodziny białek Hsp70 oraz (iii) ewolucją systemu białek opiekuńczych oraz ich rolę w procesie biogenezy centrów FeS. Co ważne, Doktorant dyskutuje także zagadnienia, które pozostają do zbadania w przyszłości. Podobnie jak całość pracy, rozdział ten czyta się dobrze.

- Proszę wymienić ograniczenia techniki HDX-MS, o których Pan wspomina.



- Duże fragmenty dyskusji nie mają przypisanych referencji np. strony 130-131.

Podsumowanie

Wspomniane wcześniej uwagi oraz błędy językowo-redakcyjne nie mają wpływu na moją wysoką ocenę przedstawionej pracy, jej wartości merytorycznej oraz znaczenia przeprowadzonych badań. Wyniki eksperymentów przedstawione w rozprawie są istotne dla zrozumienia molekularnego mechanizmu działania mitochondrialnego systemu białek opiekuńczych uczestniczących w biogenezie centrów FeS. Ponadto, ponieważ zaburzenie biogenezy FeS u człowieka jest przyczyną wielu chorób często kończących się śmiercią, przedstawione badania pomogą zrozumieć molekularne podłoże tych schorzeń a w dłuższej perspektywie mogą przyczynić się do opracowania skutecznej terapii.

Należy podkreślić, że mgr Marcin Jeleń jest współautorem, powiązanych z tematem pracy doktorskiej, trzech publikacji w prestiżowych czasopismach naukowych (*International Journal of Molecular Sciences*, IF ~6,6, *Journal of Biological Chemistry*, IF ~5,3, oraz *Journal of the American Chemical Society*, IF ~16,4). Jestem przekonana, że wyniki bezpośrednio związane z badaniami realizowanymi w ramach rozprawy doktorskiej będą bardzo dobrze opublikowane i wzbudzą duże zainteresowanie.

Podsumowując, biorąc pod uwagę merytoryczną i innowacyjną wartość pracy, znaczenie przeprowadzonych badań, dużą pracowitość i różnorodność doświadczeń i analiz, a także umiejętność prezentowania i dyskusowania wyników - uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595; z późn. zm.) i jednocześnie ujętym w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 179. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr. Marcina Jelenia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz