

Warszawa, 04.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Marcina Jelenia

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

1. Ocena merytoryczna

a) trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Tematyka tej rozprawy koncentruje się na grupach żelazowo-siarkowych występujących w szerokiej gamie białek kluczowych dla m.in. metabolizmu komórkowego. Badania mechanizmów biogenezy centrów żelazowo-siarkowych wyłoniły wiele białek uczestniczących, w tym między innymi kluczowe białko szkieletowe Isu1 oraz białka opiekuńcze Ssq1 i Hsc20 pośredniczące w przekazaniu centrów żelazo-siarkowych z białka Isu1 do białek docelowych w drożdżach.

Autor zagłębia się w specyfikę tworzenia i utrzymywania kompleksu drożdżowego Ssq1:Hsc20:Isu1, koncentrując się na jego strukturze i wzajemnych oddziaływaniach. Oceniana rozprawa stanowi kontynuację wcześniej opublikowanych badań dotyczących interakcji między tymi białkami, a jej wyniki są istotne dla zrozumienia mechanizmu współpracy komponentów tego kompleksu.

b) uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki

Autor wyodrębnił oddziaływania i reszty aminokwasowe mające znaczenie w stabilizacji kompleksu, a także opisał wpływ dołączenia białka Ssq1 na sposób interakcji między Isu1 a Hsc20. Autor postawił sobie za cel analizę strukturalno-funkcjonalną kompleksu, jednakże w rozprawie zabrakło tego drugiego aspektu. Autor nie przeprowadził badań pokazujących funkcjonalne konsekwencje wyselekcjonowanych nowych mutacji na biosyntezę centrów żelazo-siarkowych w drożdżach, które to w istotny sposób wzbogaciłyby dysertację; doktorant mógłby na przykład zbadać żywotność lub fenotypy mitochondrialne wspomnianych mutantów. Interesujące wydawałoby się też zbadanie aktywności ATPazowej białka Ssq1 R450/A w kompleksie z oczyszczonymi białkami Isu1:Hsc20.

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Oceniana rozprawa doktorska została napisana po polsku. Doktorant nie ustrzegł się jednak literówek oraz błędów stylistycznych i interpunkcyjnych.

2. ocena metodologiczna

a) dobór literatury i umiejętność jej wykorzystania

Imponuje wiedza Doktoranta i jego zainteresowanie daną tematyką. Jednakże doradzałbym Autorowi, żeby rozwijał umiejętność selekcji informacji i syntetycznego ujęcia tematu. Dyskusja jest zbyt szczegółowa, nieuporządkowana - zabrakło w niej klarownego przedyskutowania otrzymanych wyników w kontekście obecnej wiedzy.

b) poprawność formułowania problemów badawczych

Wartość merytoryczna dotycząca analizy strukturalnej kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1 rozprawy nie budzi zastrzeżeń. Interpretacja i wnioski są poprawne, ale zastanawiam się, czy analiza danych z HDX-MS jest wystarczająco szczegółowa i czy Autor mógłby „z większym rozmachem” podjąć się interpretacji zaobserwowanych zmian na podstawie odkrytych białkowych sekwencji ulegających „protekcji”. Jestem ciekawy, czy według Autora zidentyfikowane mutacje w HSPA9 (HSP70), które są odpowiedzialne za rzadką chorobę niedokrwistości opisane w publikacji naukowej w czasopiśmie Blood z 2015 (<https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-659854>), mogłyby być związane z zaburzeniem tworzenia kompleksu Ssq1:Hsc20:Isu1, pod warunkiem, że byłyby obecne w drożdżowym Ssq1?

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych

Autor bardzo dobrze opanował technikę oczyszczania białek i skrupulatnie wykonał eksperymenty biochemiczne. Ich dokładność i zastosowane kontrole nie budzą zastrzeżeń. Również wnioski z przeprowadzonych eksperymentów są poprawne. Część metodyczna została szczegółowo opisana. Doktorant trafnie i odważnie dobrał nowoczesną metodę (HDX-MS), by śledzić oddziaływania występujące w kompleksie Ssq1:Hsc20:Isu1. Nie znalazłem w rozprawie dyskusji, dlaczego autor nie pokusił się również o analizy strukturalne oparte o Cryo-EM, skoro zdołał w dużej ilości wyprodukować pojedyncze białka jak i kompleks.

d) prawidłowość struktury pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa opisana została na 143 stronach, podzielona na części obejmujące: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, materiały i metody zastosowane w pracy, wyniki oraz dyskusję. Praca ma zatem prawidłowy układ i struktury podziału treści. Jednakże zawartość poszczególnych części mogłaby być bardziej przemyślana, zwięzła i uporządkowana, bez powtórzeń w treści. W części eksperymentalnej wystarczyło umieścić wyniki otrzymane w czasie doktoratu, a wyniki opisane w publikacjach przenieść do dyskusji. Natomiast można było tu umieścić (a nie jak to zostało poruszone dopiero w dyskusji) opis zaobserwowanych różnic w dynamice oddziaływań między dimerem Isu1:Hsc20 a kompleksem złożonym z trzech białek Ssq1:Hsc20:Isu1. W przypadku tak obszernej rozprawy pomocne byłyby dodatkowe schematy czy tabele podsumowujące otrzymane wyniki, co zdecydowanie ułatwiłoby czytelnikowi analizę uzyskanych rezultatów. Praca ma staranną szatę graficzną, poza figurą 40 prezentującą widmo natywnej spektroskopii masowej, która mogłaby być lepszej jakości.

Podczas obrony chciałbym prosić Doktoranta o przedyskutowanie następujących kwestii:

i) Autor zacytował pracę wykazującą, że oddziaływanie Isu1 z Hsc20 chroni Isu1 przed degradacją przez proteazę Pim1 (Lon). Czy Autor mógłby przedyskutować potencjalny wpływ wiązania Ssq1 do kompleksu Isu1:Hsc20 na degradację Isu1 przez Pim1?

ii) Chciałbym również prosić Autora o przedyskutowanie, czy zaobserwowana rola Pim1 w metabolizmie DNA (10.1074/jbc.M309642200) mogłaby mieć znaczenie w regulacji aktywności polimeraz DNA zawierających centra żelazo-siarkowe (10.1038/nchembio.721)?

iii) Czy Autor mógłby również omówić usytuowanie centrum żelazo-siarkowego w białku Isu1 względem cząsteczki Ssq1 i jaki to może mieć wpływ na uwolnienie Fe-S z kompleksu podczas wiązania ATP przez Ssq1?

3. Ocena

Przedstawiona mi do oceny rozprawa świadczy o solidnym teoretycznym przygotowaniu Autora i Jego zainteresowaniu w wykorzystaniu metod biologii strukturalnej do zrozumienia procesu biogenezy centrów żelazo-siarkowych w drożdżach. Autor doskonale opanował techniki biochemiczne, które z powodzeniem zastosował w celu potwierdzenia wyników uzyskanych metodą HDX-MS. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego wnioskuję o dopuszczenie p. mgra Marcina Jelenia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Wojciech Pokrzywa