



Wrocław, 27 września 2023 r.

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Grabińskiej-Rogali

## „Oddziaływania systemu Hsp70 z substratem białkowym oraz rola tych oddziaływań w zależności od proteazy Lon degradacji substratu”

Pomimo wielu lat badań nad mechanizmem działania białek opiekuńczych HSP70 ważne elementy związane z ich aktywnością biologiczną są ciągle niepoznane. Te polipeptydy współpracując z białkami posiadającymi domenę J (JDP) kontrolują nie tylko homeostazę białek komórkowych, ale również wyspecjalizowane procesy, takie jak biogeneza centrów żelazowo-siarkowych (FeS) lub uwalnianie zawartości pęcherzyków opłaszczonych klatryną. Aktywność biologiczna białek HSP70 związana jest z oddziaływaniem z polipeptydowym substratem, domeną J oraz hydrolizą ATP. Poznanie molekularnego mechanizmu tworzenia potrójnego kompleksu Hsp70(ATP)-JDP substrat uczestniczącego w biogenezie FeS było zasadniczym tematem rozprawy doktorskiej Pani mgr Anety Grabińskiej-Rogali. Praca została zrealizowana pod opieką profesora Jarosława Marszałka, posiadającego znaczący dorobek naukowy w badaniach białek opiekuńczych oraz odpowiednie zaplecze aparaturowe do przeprowadzenia tego typu analiz. Promotorem pomocniczym rozprawy był dr. hab. Rafał Dutkiewicz.

Recenzowana praca liczy 90 stron i została podzielona w tradycyjny sposób na rozdziały: Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja oraz Bibliografia. Wstęp pracy liczy 15 stron, został napisany starannie i zawiera wszystkie elementy konieczne do zrozumienia przeprowadzonych badań. Doktorantka napisała tę część pracy w sposób bardzo zwięzły, ilustrując przedstawione treści za pomocą klarownych rycin. Zamieszczony we wstępie opis skomplikowanej maszynerii białkowej biorącej udział w biogenezie centrów FeS jest szczegółowy, zawiera kluczowe informacje o białkach opiekuńczych, rusztowania oraz pomocniczych pochodzących z organizmów prokariotycznych oraz eukariotycznych. Końcowy podrozdział wstępu przedstawia informacje o degradacji białek rusztowania przez proteazę Lon. Omawiając różne składowe systemu biogenezy FgS oraz mechanizm jego powstawania Mgr Grabińska-Rogala umiejętnie wskazała, które etapy są mało poznane lub nieznane i wymagają

dalszych badań, co konsekwentnie stało się przedmiotem jej pracy opisanej w dalszej części rozprawy.

W rozdziale Metody Doktorantka szczegółowo przedstawiła stosowaną w pracy metodykę badań. Opis procedur jest napisany klarownie i pozwala czytelnikowi odtworzyć opisany tok postępowania z preparatami oraz wykonane w pracy eksperymenty.

Do najważniejszych wyników mgr Grabińskiej-Rogali opisanych w rozprawie zaliczam:

Otrzymanie 26 natywnych, homogennych, rekombinowanych białek pochodzących z *E. coli* oraz *S. cerevisiae*, na których zostały przeprowadzone dalsze badania.

Analizę aktywności wariantu T239A białka ATPazy Ssq1\* celem wykazania braku aktywności ATPazowej w stanie wolnym oraz w obecności JDP Hsc20, Mge1 oraz Isu1. Otrzymany wynik pozwala zrozumieć stabilność potrójnego kompleksu Ssq1\*-Hsc20-Isu1.

Wykazanie, że oddziaływanie białkowego rusztowania, na którym zachodzi synteza FeS (Isu1) z kieszenią wiążącą substrat domeny SBD $\beta$  HSP70 (Ssq1) jest konieczne do powstania potrójnego kompleksu z białkiem JDP (Hsc20) a sekwencja LPPVK białka Isu1 oddziałująca z Ssq1 w obrębie kieszeni wiążącej substrat jest niezbędne dla formowania tej struktury. Doktorantka zaobserwowała, że mutacja Ssq1\* V472F zaburza, a F462S całkowicie uniemożliwia wiązanie substratu *in vitro*. Badania przeprowadzono z zastosowaniem mutantów Ssq1, które wcześniej sprawdzono pod kątem poprawnego zwinięcia białka.

Zaobserwowanie, że Hsc20 oraz Isu1 mogą oddziaływać samodzielnie z <sup>GST</sup>Ssq1\*, ale w wysokich, niefizjologicznych stężeniach tych białek. Doświadczenia przeprowadzono dla szeregu stężeń Hsc20 lub Isu1, analizując efektywność powstawania kompleksu oraz stosując jako kontrolę mutanty Hsc20 oraz Isu1 nietworzące kompleksu z Ssq1.

Zbadanie kinetyki powstawania kompleksów badanych białek w czasie rzeczywistym. Doktorantka przeprowadziła szereg pomiarów z użyciem techniki interferometrii biowarstwowej. Analizy z użyciem immobilizowanego Isu1<sup>GST</sup> potwierdziły wcześniejsze obserwacje dotyczące oddziaływania partnerów oraz wykazały stechiometrię 1:1:1 dla kompleksu Ssq1\*-Hsc20-Isu1, ponadto zaobserwowano dwufazową kinetykę wiązania. Dalsze analizy wykazały, że w pierwszym, bardzo szybkim etapie Hsc20 wiąże Isu1, następnie kompleks Hsc20-Isu1 dużo wolniej oddziałuje z Ssq1.

Analizy tworzenia potrójnego kompleksu z użyciem wariantów białek, zawierających mutacje zaburzające oddziaływania pomiędzy poszczególnymi składowymi kompleksu. Doktorantka wykonała szereg pomiarów kinetycznych, używając wariantów białek Hsc20 oraz Ssq1

potwierdzając, że mutacje w rejonie oddziaływań białko-białko pomiędzy komponentami potrójnego kompleksu hamuje jego formowanie.

Eksperymentalne potwierdzenie istnienia dodatkowego miejsca oddziaływania pomiędzy domeną CTD białka Hsc20 a NBD białka Ssq1. Wykonując pomiary kinetyczne z użyciem mutein Hsc20, w których podstawiono dodatkowo naładowane reszty 132 oraz 172, mgr Grabińska-Rogała wykazała, że te łańcuchy boczne są niezbędne dla formowania potrójnego kompleksu.

Przeprowadzenie analizy degradacji białka rusztowania – drożdżowego IscU przez proteazę Lon oraz wykazanie, że białka opiekuńcze HscB oraz SBD-HscA podobnie jak desulfuraza cysteinowa (IscS) chronią je przed proteolizą. Dodatkowo doktorantka wyznaczyła powinowactwo pomiędzy IscU a HscB, SBD-HscA oraz IscS. Otrzymane wyniki wskazują, że białka opiekuńcze poprzez kontrolę degradacji IscU wpływają na jego poziom w komórce.

Tok postępowania w pracy oraz analiza wyników jest logiczna i składa się w spójną całość. Dyskusja podsumowująca otrzymane wyniki została napisana bardzo dobrze. Doktorantka krytycznie analizuje rezultaty swoich badań porównując je z aktualnymi danymi literaturowymi. Otrzymane w pracy wyniki są wartościowe, a zaproponowany mechanizm formowania potrójnego kompleksu jest kolejnym ważnym krokiem w zrozumieniu działania białek opiekuńczych.

Praca jest napisana starannie, praktycznie nie zawiera błędów. Do doktorantki mam kilka pytań:

Jaki jest średni czas istnienia kompleksu Hsp70(ATP)-JDP-substrat w komórkach (*in vivo*)?

Czy HSP70 może wiązać inne trifosforany nukleozydów i czy może to wpływać na jego aktywność?

Jaki może być powód krótkiego czasu półtrwania białka Icu1. Czy może uczestniczyć w innych procesach/zaburzać inne procesy komórkowe i z tego powodu jest szybko degradowane?

Czy dimery białek tworzone przez GST mogą wpływać na mechanizm lub kinetykę działania analizowanych białek? Czy podejmowano próby immobilizacji białek do sensora w inny sposób, niż za pomocą GST (np. przez grupy aminowe, His-tag)?

Na wykresach przedstawiających kinetykę oddziaływania IcuU z HscB dla stężeń ponad 1  $\mu\text{M}$  można zauważyć znaczące zaburzenia (Rycina 23). Czy wykonano pomiary oraz analizy oddziaływania dla szeregu stężeń białek poniżej 1  $\mu\text{M}$ ?

Podsumowując, badania wykonane przez doktorantkę znacząco poszerzają wiedzę na temat molekularnych podstaw aktywności białka HSP70. Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej „Oddziaływania systemu Hsp70 z substratem białkowym oraz rola tych oddziaływań w zależnej od proteazy Lon degradacji substratu” jest wysoka, a rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 ust 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie

wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Wnoszę o dopuszczenie mgr Anety Grabińskiej-Rogali przez Radę Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Daniel Krowarsch