

Warszawa, 15-09-2023

**Dr hab. Roman Szczęsny**

Pracownia Biologii RNA

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Grabińskiej-Rogali***

***“Oddziaływania systemu Hsp70 z substratem białkowym oraz rola tych oddziaływań w zależnej od proteazy Lon degradacji substratu”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anety Grabińskiej-Rogali została wykonana w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Prace badawcze zostały przeprowadzone pod kierunkiem prof. dra hab. Jarosława Marszałka. Funkcję promotora pomocniczego pełnił dr hab. Rafał Dutkiewicz, prof. UG.

Białka opiekuńcze pełnią kluczową rolę w homeostazie białek. Ich funkcja umożliwia m.in. odpowiednie zwijanie polipeptydów, transport białek przez błony lub też przenoszenie centrów żelazo-siarkowych z białka rusztowania na białko docelowe. Mechanizm molekularny działania białek opiekuńczych, a zwłaszcza białek wspierających biogenezę białek posiadających centra żelazo-siarkowe jest przedmiotem wieloletnich badań. Jednakże, pomimo intensywnych prac niektóre z etapów biogenezy centrów żelazo-siarkowych wciąż są mało poznane. W ramach swojej rozprawy doktorskiej mgr Aneta Grabińska-Rogala podjęła się szeregu analiz biochemicznych mających na celu opisanie mechanizmu tworzenia kompleksu mitochondrialnego białka Hsp70 (Ssq1) z białkiem pomocniczym (Hsc20) i substratem (Isu1) oraz weryfikacji hipotezy o możliwej roli białek opiekuńczych w regulacji poziomu białka rusztowania (IscU) u bakterii. Doktorantka opierając się na wynikach wcześniejszych prac badawczych, w tym prac przeprowadzonych przez zespół prof. Marszałka, sformułowała kilka precyzyjnych, szczegółowych celów badawczych.

Wykorzystując techniki biologii molekularnej oraz biochemii Doktorantka uzyskała imponującą liczbę 26 preparatów oczyszczonych białek, które wykorzystwała do przeprowadzenia serii analiz biochemicznych. Co ważne, Doktorantka w swoich badaniach efektywnie wykorzystwała procedury eksperymentalne dotychczas opracowane w zespole, ale również opracowała nowe. Przykładowo, w większości analiz tworzenia kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 Doktorantka wykorzystwała procedurę stosowaną w zespole, w której jako przynętę stosuje się białko Isu1, a dodatkowo Doktorantka wykazała, że tworzenie tego kompleksu można analizować z zastosowaniem białka Ssq1 lub Hsc20 jako przynęty.

Z wcześniejszych prac wiadomo było, że kompleks Ssq1-Hsc20-Isu1 może zostać oczyszczony w przypadku, gdy treonina w pozycji 239 białka Ssq1 zostanie zastąpiona alaniną. Analizy porównawcze sekwencji aminokwasowej białek Hsp70 sugerowały, że wskazana substytucja aminokwasowa najprawdopodobniej zaburza aktywność hydrolizy ATP przez białko Ssq1. Istotnie, mgr Aneta Grabińska-Rogala wykazała, że drożdżowe białko Ssq1 ze zmianą p. Thr239Ala nie posiada aktywności hydrolizy ATP, co według Doktorantki najprawdopodobniej tłumaczy stabilność analizowanego kompleksu, który w „normalnych” warunkach, tj. w przypadku analizy białek o niezmienionej sekwencji aminokwasowej, ma charakter przejściowy i jest niestabilny. W kolejnym etapie badań Doktorantka zweryfikowała eksperymentalnie rolę tzw. kieszeni wiążącej substrat występującej w białku Ssq1. Przeprowadzone badania pozwoliły wykazać, że analizowany obszar białka Ssq1 jest niezbędny dla wiązania substratu. Doktorantka zidentyfikowała dwie reszty aminokwasowe, których zmiana powoduje utratę (p. F462S) lub obniżenie (p. V472F) wiązania substratu *in vitro*. Wykorzystując technikę interferometrii biowarstwy Doktorantka przeprowadziła analizę kinetyki formowania kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1. Analiza ta pozwoliła potwierdzić przypuszczone etapy tworzenie kompleksu. Badania wykonane przez mgr Anetę Grabińską-Rogalę wskazują, że w pierwszym etapie dochodzi do utworzenia dwuskładnikowego kompleksu Hsc20-Isu1, który następnie oddziałuje z białkiem Ssq1 tworząc funkcjonalny kompleks trójskładnikowy. Co ważne, Doktorantka potwierdziła wcześniejsze obserwacje, uzyskane z wykorzystaniem innych metod badawczych, że utworzenie kompleksu Ssq1-Hsc20-Isu1 wymaga oddziaływań między wszystkimi podjednostkami. Ponadto, wykazała istnienie dodatkowych, dotychczas nieopisanych miejsc oddziaływań pomiędzy białkiem Hsc20 i Ssq1. Ten etap badań uznaję za szczególnie interesujący w kontekście analiz porównawczych wskazujących, że opisane oddziaływania mogą być specyficzne dla białek Hsc20, które nie współpracują z wielofunkcyjnymi mitochondrialnymi białkami mtHsp70.

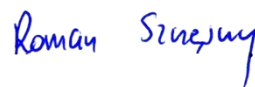
Drugi aspekt badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej dotyczył roli białek opiekuńczych w regulacji poziomu białka rusztowania, tj. białka na którym odbywa się synteza centrów żelazo-siarkowych. Z wcześniejszych badań wiadomo było, że poziom drożdżowego białka rusztowania (Isu1) zależy od jego oddziaływania z białkiem pomocniczym Hsc20 i desulfurazą cysteinową. Doktorantka wykazała, że w warunkach *in vitro* oddziaływanie bakteryjnego białka rusztowania (IscU) z bakteryjnym białkiem pomocniczym HscB, domeną SBD białka opiekuńczego HscA lub desulfurazą cysteinową IscS chroni białko IscU przed degradacją zależną od proteazy Lon. Tym samym, wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Anetę Grabińską-Rogalę wskazują, że zarówno u bakterii jak i w mitochondriach drożdży poziom białka rusztowania może być regulowany przez białka pomocnicze i opiekuńcze. W nawiązaniu do tej części rozprawy prosiłbym o komentarz dotyczący niepełnej degradacji białka IscU w warunkach inkubacji tego białka z proteazą Lon – Rycina 20A. Prosiłbym również o informację co wiadomo na temat regulacji poziomu białka Hsc20 lub HscB. Czy wiadomo aby poziom tych białek był regulowany?

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii w języku polskim, z zastosowaniem klasycznego podziału tekstu na: wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, spis literatury oraz streszczenie napisane w języku polskim oraz angielskim. Praca napisana jest w sposób zwięzły i interesujący. Rozdział „Wstęp” stanowi dobre zapoznanie czytelnika z tematyką przeprowadzonych badań. Doktorantka przygotowując tę część rozprawy wykazała się znajomością literatury dotyczącej przedmiotu badań, jednocześnie uniknęła nadmiernego rozbudowania rozdziału. Rozdziały „Materiały” i „Metody” przygotowano w sposób umożliwiający analizę przeprowadzonych eksperymentów, a w przyszłości ich powtórzenie przez niezależnych badaczy. W rozdziale „Wyniki” Doktorantka przedstawiła wyniki przeprowadzonych eksperymentów, które stanowią cykl logicznie

zaplanowanych eksperymentów. Doktorantka w umiejętny sposób opisała osiągnięcia zespołu w badanej tematyce wskazując jakimi informacjami dysponowała rozpoczynając badania. Jednocześnie precyzyjnie określiła udział lub wsparcie ze strony innych badaczy w przeprowadzonych badaniach, co nie wpływa na jej wiodącą rolę w opisanych badaniach. Wykonujące prace badawcze Doktorantka przeprowadziła szereg analiz kontrolnych, które wzmacniają znaczenie uzyskanych wyników. Przykładowo, w przypadku analizy białek z wprowadzonymi zmianami w sekwencji aminokwasowej Doktorantka wykonała analizy kontrolne, aby sprawdzić czy wprowadzone zmiany nie mają globalnego wpływu na strukturę drugorzędową. Doktorantka w zwięzły i umiejętny sposób interpretuje wyniki swoich badań w rozdziale „Dyskusja”. Treść tego rozdziału rozprawy doktorskiej potwierdza umiejętność prowadzenia pracy naukowej przez mgr Anetę Grabińską-Rogalę oraz wiedzę Doktorantki w dyscyplinie.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Anety Grabińskiej-Rogali **ocenię pozytywnie**. Praca ta stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.).

**Wnioskuje do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Anety Grabińskiej-Rogali do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**



*dr hab. Roman Szczęśny*