

Prof. UG dr hab. Sylwia Jafra  
Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii UG i GUMed  
Ul. A. Abrahama 58  
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 10. 05. 2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Majewskiej, pt.:**  
**„Analiza strukturalno-funkcjonalna oddziaływania desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11) z białkami uczestniczącymi w syntezie centrów żelazo-siarkowych”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Julii Majewskiej jest oryginalnym opracowaniem, wykonanym pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Marszałka, w Pracowni Biochemii Ewolucyjnej MWB UG i GUMed. Celem badań było określenie znaczenia oddziaływania desulfurazy cysteinowej z białkiem rusztowania molekularnego Isu1 oraz frataksyną Yfh1 - białkami zaangażowanymi w syntezę centrów żelazo-siarkowych w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*.

Centra żelazo-siarkowe występujące we wszystkich domenach życia, są grupami prostetycznymi wielu białek enzymatycznych. Centra te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania i przeżycia komórki, uczestnicząc min. w procesach związanych z przenoszeniem elektronów, katalizą, regulacją ekspresji genów, naprawą DNA, czy odpowiedzią na stres. Białka odpowiedzialne za syntezę centrów FeS są ewolucyjnie konserwowane od komórek bakterii do organizmu człowieka.

W latach 90tych ubiegłego wieku opisano pierwszy operon kodujący białka uczestniczące w biogenezie centrum FeS bakteryjnej nitrogenazy w komórkach *Azobacterium vinelandii*. Odrzucono tym samym teorię o spontanicznym tworzeniu się centrów FeS w organizmach żywych. W procesie formowania centrów FeS *in vivo* uczestniczy szereg wyspecjalizowanych białek odpowiedzialnych za ich syntezę oraz dostarczenie do białek akceptorowych. W komórkach bakterii wyróżnia się trzy systemy biogenezy centrów FeS: NIF (ang. nitrogen fixation), SUF (ang. sulfur mobilization) oraz ISC (ang. iron-sulfur cluster). Natomiast komórki eukariotyczne odziedziczyły z komórek prokariotycznych system SUF (obecny w plastydach roślin) oraz ISC (obecny w mitochondriach). Mitochondrialny system ISC warunkuje syntezę pozamitochondrialnych (cytoplazmatycznych i jądrowych) białek FeS.

Zaburzenie prawidłowego funkcjonowania białek zaangażowanych w biosyntezę centrów FeS lub białek zawierających tę grupę prostetyczną prowadzi do nieprawidłowego funkcjonowania lub śmierci komórek mikroorganizmów oraz do rozwoju jednostek chorobowych u ludzi. Jedną z nich jest ataksja Friedreicha, dziedziczna choroba neurodegeneracyjna, będąca genetyczną ataksją autosomalną. Zaburzenie syntezy frataksyny (wynikające z mutacji dynamicznych w pierwszym intronie genu kodującego to białko) prowadzi do zakłócenia biogenezy centrów FeS, a w konsekwencji do akumulacji żelaza w mitochondriach i stresu oksydacyjnego. Ponadto, zaburzenia biogenezy centrów FeS może prowadzić do miopatii mitochondrialnej lub rzadkich form anemii sideroblastycznej. Również dysfunkcja transferu centrów FeS do kompleksu I łańcucha oddechowego może być przyczyną mitochondrialnej encefalomiopatii.

W komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* białka systemu ISC kodowane przez genom jądrowy, zawierają sekwencję kierującą, która jest odcinana po zaimportowaniu białek do mitochondrium. Synteza centrum FeS wymaga oddziaływania desulfurazy cysteinowej Nfs1, białka rusztowania Isu1 oraz frataksyny Yfh1. Białko Yfh1 reguluje aktywność kompleksu białka Nfs1 z białkiem Isd11; białko Nfs1(Isd11) dostarcza siarkę do syntezy centrum w obrębie białka Isu1. Utworzone w obrębie białka rusztowania Isu1 centrum FeS, w kolejnym etapie, jest przenoszone na białko akceptorowe. Proces ten wymaga współdziałania wyspecjalizowanych białek opiekuńczych Jac1 i Ssq1. Białko Jac1 to białko pomocnicze typu J, które przenosi substrat Isu1(FeS) na białko Ssq1 należące do rodziny białek opiekuńczych Hsp70. Badania zespołu prof. J. Marszałka z Pracowni Biochemii Ewolucyjnej skupiają się na wyjaśnieniu molekularnych mechanizmów oddziaływań pomiędzy poszczególnymi komponentami systemu biogenezy centrum FeS w komórkach drożdży. Wyniki uzyskane przez mgr Julię Majewską dostarczyły nowej wiedzy dotyczącej mechanizmu odpowiedzialnego za przebieg i regulację tego procesu. O dużym znaczeniu i oryginalności prowadzonych przez panią mgr Julię Majewską badań świadczy to, że uzyskane wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie naukowym (*Journal of Biological Chemistry* (2 publikacje - w jednej publikacji mgr J. Majewska jest pierwszym autorstwem, w drugiej, zawierającej część wyników pracy doktorskiej, jest współautorem), czyli zostały docenione przez ekspertów. Mgr J. Majewska jest także współautorem publikacji opublikowanej w *Journal of Molecular Biology*.

Poniżej przedstawiam najważniejsze osiągnięcia pracy mgr. Julii Majewskiej.

Badania **pokazują istotną rolę oddziaływania desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11) z białkiem Isu1 dla procesu syntezy centrów FeS oraz dla stabilności tego białka**. Wykorzystując narzędzia bioinformatyczne, w oparciu o sekwencje homologiczne Doktorantka uzyskała modele strukturalne białek Nfs1 i Isu1, które porównała z modelami strukturalnymi homologów tych białek z innych mikroorganizmów. Struktura frataksyny była określona eksperymentalnie dla białka Yfh1 z komórek *S. cerevisiae* oraz jego homologów. Analiza uzyskanych modeli pozwoliła na stwierdzenie, że struktury białek syntezy centrów FeS zostały zachowane w procesie ewolucji. Następnie w oparciu o techniki biochemiczne Doktorantka wykazała, że białko Nfs1(Isd11) tworzy stabilne kompleksy z białkiem Isu1 w ekstrakcie





komórkowym. Za oddziaływanie pomiędzy tymi białkami mogą odpowiadać określone reszty aminokwasowe o charakterze hydrofobowym znajdujące się na powierzchni oddziaływania. Wytypowane reszty białka Nfs1 to prolina w pozycji 478 (P478), leucyna w pozycji 479 (L479) oraz metionina w pozycji 482 (M482). Natomiast w przypadku białka Isu1 wytypowane reszty to: leucyna w pozycji 63 (L63), walina w pozycji 72 (V72) oraz fenyloalanina w pozycji 94 (F94). Wybrane reszty aminokwasowe były konserwowane ewolucyjnie.

Dalsze badania prowadzone *in vivo* wykazały, że **formowanie kompleksu Nfs1(Isd11)-Isu1 jest konieczne dla procesu syntezy centrum FeS niezbędnego dla przeżycia komórki**. Wyniki doświadczeń, pokazały, że substytucja dwóch wytypowanych aminokwasów L479 i M482 białka Nfs1 na alaninę powoduje utratę zdolności tego białka do oddziaływania z białkiem Isu1, a w konsekwencji do destabilizacji kompleksu Nfs1(Isd11)-Isu1. Utrata możliwości tworzenia tego kompleksu skutkowało utratą zdolności formowania centrów FeS *in vivo*, co prowadziło do śmierci komórek drożdży. Podobne wyniki zaobserwowano w przypadku substytucji wytypowanych reszt aminokwasowych L63, V72 i F94 białka rusztowania Isu1; wymiana tych reszt na alaninę skutkowało obniżeniem oddziaływania wariantu Isu1<sub>L63/V72/F94/AAA</sub>-GST z białkiem Nfs1(Isd11) o 65% w stosunku do wariantu białka Isu1 dzikiego typu, natomiast wymiana wytypowanych reszt na serynę powodowała obniżenie tego oddziaływania o 85%. Zaburzenie formowania kompleksu skutkowało śmiercią komórek drożdży.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka **pokazała, że desulfuraza cysteinowa Nfs1(Isd11) wiąże drożdżowy homolog frataksyny, białko Yfh1 poprzez sieć oddziaływań elektrostatycznych**, a miejsce wiązania Yfh1 stanowi kieszeń utworzona między powierzchnią oddziaływania białka Nfs1 z białkiem Isu1. Na podstawie wcześniej uzyskanego modelu mgr. J. Majewska wytypowała aminokwasy kluczowe dla oddziaływania pomiędzy białkiem Nfs1 i Yfh1; obejmują one reszty: argininy w pozycjach 313, 316 oraz 318 białka Nfs1 oraz reszty kwasu asparaginowego w pozycji 86 (D86) oraz kwasu glutaminowego w pozycji 89 (E89) w przypadku białka Yfh1. Reszty argininy białka Nfs1 znajdują się w regionie sekwencji kierującej białko Nfs1 do jądra komórkowego. Zaburzenie sekwencji w tym regionie zakłóca transport wewnątrzkomórkowy tego białka, i w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki. Odpowiednio zaprojektowane doświadczenia pozwoliły na zbadanie udziału wytypowanych reszt argininy białka Nfs1 w wiązaniu Yfh1 w mitochondriach, nie pozbawiając komórek drożdży jądrowej kopii białka Nfs1. **Uzyskane wyniki wykazały, że wytypowane reszty są niezbędne do prawidłowego działania białka Nfs1 w mitochondrium, gdyż warianty białka Nfs1 z substytucją reszt argininy na alaninę bądź kwas glutaminowy skutkowało śmiercią komórek drożdży.**

Wykorzystując techniki oparte o genetykę drożdży mgr. J. Majewska zweryfikowała wpływ wytypowanych reszt aminokwasowych białka Yfh1, tj. kwasu asparaginowego D86 oraz kwasu glutaminowego E89 na przeżywalność komórek drożdży. **Substytucja reszt D86 i E89 na alaninę w wariacie Yfh1<sub>DE/AA</sub> nie miała wpływu na tempo wzrostu komórek drożdży, natomiast wymiana tych**





**reszt na lizynę w wariancie Yfh1<sub>DE/KK</sub> powodowała upośledzenie wzrostu komórek drożdży.** Uzyskane wyniki wskazywały na zaburzenie biologicznej roli frataksyny. *Czy są jakieś przesłanki wyjaśniające inną rolę reszt argininy w pozycjach R313, R316 i R318 białka Nfs1 oprócz ich zaangażowania w oddziaływanie z Yfh1 w mitochondriach drożdży?*

Ciekawym wynikiem badań jest obniżenie stężenia wariantu białka Yfh1<sub>DE/AA</sub> w stosunku do formy białka Yfh1 dzikiego typu, co sugeruje wpływ podstawienia na stabilność tego białka oraz zdolność utrzymywania fizjologicznego tempa wzrostu przez komórki drożdży przy niewielkim poziomie frataksyny. Natomiast w przypadku wariantu Yfh1<sub>DE/KK</sub> obserwowano wyższe stężenie tego wariantu w stosunku do formy białka Yfh1 typu dzikiego. Sugeruje to istnienie w komórce drożdży mechanizmu kompensującego zaburzenia biologicznej funkcji frataksyny. Potwierdziły to kolejne badania wykorzystujące wariant białka Isu1 z substytucją metioniny w pozycji 141 na izoleucynę. Ekspresja wariantu Isu1<sub>M/I</sub> skutkowałą zahamowaniem akumulacji wariantu Yfh1<sub>DE/KK</sub>. Otrzymane wyniki wskazują, że substytucja aminokwasu w obrębie białka Isu1 kompensuje syntezę centrów FeS. Dane literaturowe oraz wyniki uzyskane przez Doktorantkę i zespół Pracowni Biochemii Ewolucyjnej wskazują, że zaburzenie oddziaływania Nfs1(Isd11) z Yfh1 powoduje obniżenie stężenia białek FeS, aktywności akonitazy oraz akumulację żelaza w natomiast może wpływać na wydajny przebieg tego procesu.

Interesujący jest wynik migracji wariantu białka Yfh1<sub>DE/KK</sub> w żelu akrylamidowym - wymiana dwóch negatywnie naładowanych reszt aminokwasowych na pozytywnie naładowaną lizynę powodowała zmianę tempa migracji analizowanego białka, mimo, że masa tego białka z wymienionymi resztami aminokwasowymi różni się od masy białka Yfh1 typu dzikiego jedynie o masę wymienionych aminokwasów. *Jakie może być wyjaśnienie tego zjawiska?*

Ostatni etap badań dotyczył oddziaływania białka rusztowania Isu1 z białkiem opiekuńczym Jac1 oraz desulfurazą cysteinową Nfs1(Isd11). **Wyniki badań wskazują, że oddziaływanie Nfs1(Isd11)-Isu1 oraz Isu1-Jac1 wzajemnie się wykluczają.** Trzy wytypowane reszty aminokwasowe L63, V72 i F94 stanowiące kieszeń hydrofobową istotną dla wiązania białka Nfs1(Isd1), są również istotne dla wiązania białka Jac1. Doświadczenia *in vitro* pokazały, że oddziaływanie białka Nfs1(Isd11) z Isu1 podczas syntezy centrum FeS wyklucza się z oddziaływaniem białka Isu1(FeS) z Jac1, które rozpoczyna transfer centrum FeS z Isu1 na białko akceptorowe.

Uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na postawienie hipotezy, że białko Jac1 destabilizuje kompleks desulfurazy cysteinowej z białkami syntezy centrum FeS, a następnie dostarcza białko rusztowania Isu1 związane z utworzonym centrum FeS do białka opiekuńczego Ssq1 inicjując etap przeniesienia centrum FeS z isu1 na białko akceptorowe. Możliwa jest też sytuacja, że powstanie centrum FeS w obrębie Isu1 zmienia powinowactwo powstałego kompleksu względem Nfs1(Isd11) i Jac1. Weryfikacja tych hipotez wymaga dalszych badań w warunkach beztlenowych, które pozwolą na rekonstrukcję centrów FeS w obrębie Isu1.





Powyższe wyniki Doktorantka uzyskała w wyniku starannie zaplanowanych i przeprowadzonych doświadczeń wykorzystując narzędzia bioinformatyczne, metody biochemiczne oraz techniki biologii molekularnej.

W formalnej ocenie rozprawy doktorskiej stwierdzam, że ma ona układ przyjęty dla tego typu opracowań doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Praca liczy 109 stron maszynopisu, zawiera 26 rycin oraz 148 pozycji literatury. Szczegółowo, praca składa się ze Streszczenia, Wstępu, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji oraz spisu literatury. Poniżej krótko omówię każde z nich.

**Streszczenie.** Rozdział ten przedstawia przedmiot badań, omawia pokrótce uzyskane wyniki, które następnie podsumowuje.

**Wstęp.** Rozdział obejmuje 5 podrozdziałów, w których Doktorantka opisała kolejno biologiczne funkcje centrów żelazo-siarkowych, systemy biogenezy centrów FeS, szczegółowo przedstawiła biogenezę centrów FeS w systemie ISC *S. cerevisiae*, a w oparciu o dotychczasowe wyniki zespołu Pracowni Biochemii Ewolucyjnej, rolę białek opiekuńczych Jac1/Ssq1 w tym procesie. Pokrótce opisała dysfunkcje procesu biogenezy centrów FeS w chorobach. Ostatni podrozdział wprowadza czytelnika w problem badawczy podjęty przez Doktorantkę. Wstęp jest napisany poprawnie i wprowadza czytelnika w tematykę badań. Z perspektywy czytelnika zainteresowanego homeostazą żelaza w komórkach, zabrakło mi w tym rozdziale informacji dotyczących roli stężenia żelaza (jego akumulacji lub braku) w komórce.

**Materiały i Metody.** Rozdział Metody obejmuje zestawienie szczepów bakteryjnych i drożdżowych, szczegółowy opis wektorów plazmidowych i przeciwciał oraz materiałów wykorzystywanych podczas przeprowadzania doświadczeń. Rozdział Metody zawiera opis procedur doświadczalnych. Oba rozdziały są napisane starannie; opisy metod przedstawione są bardzo dokładnie i w sposób zrozumiały.

**Wyniki.** Rozdział 'Wyniki' to najobszerniejsza i najciekawsza część pracy. Rozdział ten pogrupowany przez Autorkę w podrozdziały przedstawiające kolejno uzyskane wyniki, został napisany bardzo logicznie. Doktorantka kolejno stawia problemy badawcze i szczegółowo wyjaśnia uzyskane wyniki. Bardzo jasno wytłumaczona jest istota przeprowadzonego doświadczenia oraz zastosowana procedura badawcza, co ułatwia śledzenie i analizę wyników. Ponadto, uzyskane wyniki są bardzo dobrze zilustrowane i opisane.

**Dyskusja.** Ostatni rozdział pracy 'Dyskusja' zawiera krytyczne omówienie uzyskanych wyników w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych. Rozdział ten jest napisany w sposób jasny i nie pozostawia wątpliwości w kwestii umiejętności Pani mgr Julii Majewskiej do interpretacji i dyskusji wyników badań.

Rozdział ten pozwala na prześledzenie uzyskanych przez Doktorantkę wyników w świetle danych literaturowych, z uwzględnieniem najnowszych wyników uzyskanych w zespole Pracowni Biochemii Ewolucyjnej. Ułatwieniem dla czytelnika jest podział tego rozdziału na podrozdziały omawiające



UNIWERSYTET GDAŃSKI



poszczególne wyniki oraz zakończenie pracy ogólnym podsumowaniem wyjaśniającym molekularny mechanizm oddziaływań desulfurazy cysteinowej z białkiem rusztowania Isu1 oraz frataksyną Yhf1 w procesie biogenezy centrum FeS.

Prezentowana praca napisana jest poprawnym językiem z wykorzystaniem specjalistycznej terminologii naukowej. W pracy raczej nie występowały sformułowania żargonowe, ale zdarzały się błędy edytorskie, brak cytowania literatury, a także niefortunne sformułowane zdania. Powyższe, raczej drobne, usterki nie umniejszają wysokiego poziomu merytorycznego ocenianej rozprawy.

Podsumowując, przedstawione wyniki badań prowadzonych przez Panią mgr Julię Majewską stanowią oryginalny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej biogenezy centrów żelazo-siarkowych w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Pani mgr Julia Majewska wykazała się umiejętnym planowaniem eksperymentów, zdolnością wykorzystania wielu technik badawczych oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z czym, zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie Pani magister Julii Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wyniki prowadzonych badań zostały opublikowane w artykułach o zasięgu międzynarodowym, dlatego wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie prezentowanej rozprawy doktorskiej.