

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kleczewskiej

**Porównanie bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 funkcjonujących w
biogenezie centrów żelazo-siarkowych**

wykonanej w

Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod opieką

dr hab. Rafał Dutkiewicza, prof. UG

Centra żelazo-siarkowe (Fe-S) są prawdopodobnie najstarszymi ewolucyjnie kofaktorami białkowymi składającymi się z nieorganicznego żelaza i siarki, które z reguły są związane z resztami cysteinowymi białek i odgrywają rolę w transferze elektronów, determinują aktywność enzymatyczną lub funkcjonują jako sensory oksydoredukcyjne. Różnorodność procesów biologicznych, w których uczestniczą białka Fe-S jest niezwykle szeroka. U ssaków, do najbardziej znanych należą synteza i naprawa DNA, funkcjonowanie mitochondriów oraz transkrypcyjna i translacyjna regulacja ekspresji genów. Co ciekawe, chociaż biosynteza centrów Fe-S jest integralną częścią metabolizmu żelaza komórek eukariotycznych jej powiązanie z regulacją komórkowej homeostazy żelaza jest stosunkowo mało poznane, z pewnością znacznie mniej niż synteza i biodegradacja hemu, obok centrów Fe-S, jednego z najbardziej istotnych biologicznie kofaktorów białkowych zawierających żelazo. Mimo istotnego postępu, jaki dokonał się w ciągu ostatnich 20 lat, w poznaniu procesów biogenezy centrów Fe-S oraz mechanizmów ich wbudowywania do poszczególnych docelowych białek akceptorowych, zagadnienia te, ze względu na swoją złożoność, liczne interakcje w obrębie systemów białek opiekuńczych zarówno na etapie montażu i transferu centrów Fe-S wymagają dalszych badań. Tematyka pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Kleczewskiej, skoncentrowana na porównaniu funkcjonowania bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 w biogenezie centrów Fe-S zdecydowanie wychodzi na przeciw tym potrzebom. Praca stanowiła szczególne wyzwanie, gdyż



przeprowadzone przez Doktorantkę doświadczenia odtwarzania w warunkach *in vitro* procesu biogenezy i transferu centrów Fe-S, wymagały użycia licznych oczyszczonych białek, zarówno bakteryjnych (*Escherichia coli*) jak i drożdżowych (*Saccharomyces cerevisiae*), a ze względu na nieodłączną wrażliwość centrów Fe-S na podwyższone stężenie tlenu w środowisku, wymagały zastosowania warunków anaerobowych.

Rozprawa pod względem struktury ma klasyczny układ monografii z podstawowymi jej elementami takimi jak polsko- i angielskojęzyczne streszczenia, wstęp, cele pracy, materiały, metody i bibliografia (wyjątkowo obszerna). Doktorantka nie zdecydowała się na krótkie podsumowanie, ewentualnie powiązane z wnioskami, co zasadniczo nie jest uchybieniem ale zawsze jest pomocne przy lekturze rozprawy zwłaszcza dla Recenzenta.

Wstęp jest solidnym, wartościowym opracowaniem zawierającym wyczerpującą charakterystykę systemów biogenezy centrów Fe-S u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, ich ogólne porównanie oraz przedstawiającym szczegółowe oddziaływania między poszczególnymi białkowymi komponentami systemu ISC, z położeniem nacisku na system białek Hsp70, również w ewolucyjnym aspekcie. Ciekawym podrozdziałem **WSTĘPU** jest podrozdział **1.5 Mitochondrialna biogeneza białek Fe-S pełni kluczową rolę podczas regulacji homeostazy żelaza w komórkach**. Stanowi on ważną próbę powiązania biogenezy centrów Fe-S z komórkowym metabolizmem żelaza i ukazania jej roli w regulacji komórkowej homeostazy tego mikroelementu. Zaletą **WSTĘPU** są liczne czytelne schematy oraz strukturalne modele białek, pomagające w śledzeniu treści zawartych w opisach. We **WSTĘPIE** zabrakło, moim zdaniem, odrębnego, zwięzłego przedstawienia aktualnej wiedzy na temat biogenezy centrów Fe-S w komórkach ssaków ewentualnie człowieka. Taki opis byłby istotny w kontekście niemałej liczby patologii występujących u człowieka, wywołanych poprzez mutacje w genach kodujących białka związane z biogenezą i transferem centrów Fe-S. Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej, uważam, że warto aby stała się przedmiotem odrębnej publikacji (nawet w języku polskim), która w moim przekonaniu przyczyniłaby się do pogłębionego postrzegania biogenezy centrów Fe-S na tle komórkowego metabolizmu żelaza przez wielu naukowców zajmujących się biologią tego mikroelementu.

Nie mam zastrzeżeń do zwięzłe i jasno sformułowanych celów rozprawy. Jedyna uwaga dotycząca tej części pracy jest taka, że być może należało dodać i przedstawić jako pierwszy, odrębny cel przeprowadzenie analizy zależności ewolucyjnych pomiędzy białkami HscA i Ssq1 na podstawie rekonstrukcji filogenezy bakteryjnych oraz eukariotycznych białek Hsp70. Zadanie to, którego realizacja wymagała zastosowania odrębnego warsztatu metodycznego otworzyła drogę do prac *stricte* doświadczalnych, których 2 cele Doktorantka zapisała w rozprawie.

Z redakcyjnego punktu widzenia, wydaje się, że rozdział **4. Rekonstrukcja procesu biogenezy centrów Fe-S** powinien stanowić jeden z podrozdziałów rozdziału **3. WYNIKI**, a nie figurować jako osobny rozdział. Pomijając tę edytorską niezręczność należy podkreślić, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są opisane w sposób konsekwentny, rzetelny i wyjątkowo klarowny.

Przeprowadzona przez Doktorantkę analiza filogenetyczna bakteryjnych oraz eukariotycznych białek Hsp70 funkcjonujących w obrębie systemu ISC wykazała, że bakteryjne białko HscA jest daleko spokrewnione z eukariotycznym białkiem Ssq1. To pierwsze nie występuje w proteomach eukariotycznych, bowiem zostało utracone podczas ewolucji mitochondriów, a jego rolę w biogenezie Fe-S przejął mitochondrialny Hsp70. Dodatkowo, dokonana rekonstrukcja filogenetyczna utwierdziła istniejący już pogląd, wg którego białko Ssq1 powstało po duplikacji genu mtHsp70, która miała miejsce u podstawy linii *Saccharomyces cerevisiae*. Wyniki tych analiz stały się podstawą do postawienia pytania o podobieństwo między dwoma różnymi białkami Hsp70 – HscA i Ssq1 w kontekście ich właściwości biochemicznych. Doktorantka podjęła zatem badania zmierzające do określenia takich właściwości jak: aktywność ATPazy, powinowactwo do substratu białkowego IscU/Isu1, oddziaływanie z białkami współpracującymi typu J – HscB/Hsc20. Przeprowadzone analizy wykazały uderzające podobieństwo we właściwościach biochemicznych obu układów. Wyniki mają istotne znaczenie dla poznania i zrozumienia funkcjonowania bakteryjnego i mitochondrialnego procesu biogenezy centrów Fe-S. Wartość tych wyników polega również na tym, że oba systemy (bakteryjny i eukariotyczny) mogą być wykorzystane jako modele badawcze, które umożliwiają przeprowadzenie w warunkach fizjologicznych analiz funkcjonalno-strukturalnych białek systemu Hsp70. Należy podkreślić, że wyniki tej części pracy zostały opublikowane przez Doktorantkę w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (Kleczewska i wsp., *Int J Mol Sci* 2020, 21, 3326). Wyprzedzając moje uwagi ogólne dotyczące rozdziału **4. DYSKUSJA**, chciałbym podkreślić, że wyniki uzyskane w tej części pracy są opatrzone bardzo przemyślanym i interesującym omówieniem. Porównując dane dotyczące stężenia białek systemu Hsp70 oraz ich powinowactwa do białka Hsc20, Doktorantka sugeruje, że wyspecjalizowane i wielofunkcyjne systemy Hsp70 wykorzystują bardzo różne strategie biochemiczne. Rozważa również potencjalne korzyści, wynikające z powstania wyspecjalizowanego kompleksu białek opiekuńczych systemu Hsp70 (będącego efektem koewolucji Hsc20 i Ssq1), który jest przystosowany do funkcjonowania wyłącznie w biogenezie centrów Fe-S.

Kolejnym etapem rozprawy doktorskiej było, uwieńczone powodzeniem, odtworzenie w warunkach *in vitro* procesu biogenezy centrum 2Fe-2S w obrębie eukariotycznego białka Isu pełniącego rolę „molekularnego rusztowania”. Ze względu na większą wydajność procedury



izolowania, białko to uzyskano ze spokrewnionego z drożdżami termofilnego grzyba *Chaetomium thermophilum* (CtIsu1). Pozostałe komponenty białkowe maszynerii pochodziły z drożdży *S. cerevisiae* a źródłami żelaza i elektronów były odpowiednio cytrynian amonowo-żelazowy (Fe(III)) i ditiotreitrol (DTT). Ze względu na użycie DTT (a nie NADPH) i brak w mieszaninie reakcyjnej białkowego tandemu przenoszenia elektronów (ferrodoksyna i jej reduktaza) przeprowadzana przez Doktorantkę rekonstrukcja centrum Fe-S nie odzwierciedlała w pełni warunków fizjologicznych. Określono jednak jej kinetykę oraz potwierdzono specyficzność przeprowadzając reakcję pod nieobecność poszczególnych komponentów białkowych. Mam prośbę o wyjaśnienie rozbieżności dotyczącej sposobu inicjacji rekonstrukcji centrum Fe-S. W legendzie Ryciny 33 Doktorantka stwierdza, że: *Start reakcji był inicjowany poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej roztworu cysteiny...*, tymczasem w opisie metodycznym na str. 105 znajduje się zapis: *Reakcję rekonstrukcji centrum FeS w obrębie IscU/Isu inicjowałam poprzez nastrzyk desulfurazą cysteinową...*

Kolejnym krokiem w pracach doświadczalnych w ramach rozprawy doktorskiej było podjęcie próby, dodam, próby zakończonej sukcesem, rekonstrukcji centrum Fe-S w obrębie jednorodnego systemu bakteryjnego, w którym białkiem pełniącym rolę „molekularnego rusztowania” było IscU z *Escherichia coli*. W realizacji tego celu przydatna okazała się współpraca z dr Benoit D’Autr aux, który w roku 2019 w artykule opublikowanym na łamach Nature Communications, 2019 8;10(1):3566 opisał rekonstrukcję centrum Fe-S na bazie mysiego białka ISCU w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Przystępując do realizacji tego zadania wyeliminowano jony cynku (Zn) z bakteryjnego preparatu IscU, które obecne w centrum aktywnym IscU mogły być przyczyną zaburzeń w formowaniu centrum Fe-S. Na marginesie interakcji Zn-IscU (czy też Zn-ISCU) nasuwa się pytanie, czy wiązanie jonu Zn w przez IscU jest artefaktem (wynikającym np. z procedury oczyszczania białka), czy też ma charakter natywny i można mu przypisać funkcję regulatorową w procesie formowania centrum Fe-S. Całą procedurę przeprowadzono w warunkach odzwierciedlających warunki fizjologiczne - przede wszystkim w obecności NADPH oraz tandemu białkowego ferrodoksyna/reduktaza ferrodoksyny. Różnica w porównaniu do metodyki odtwarzania centrum Fe-S w układzie eukariotycznym polegała również na tym, że do rekonstrukcji centrum użyto wstępnie przygotowany kompleks IscU-Fe, który znajdował się mieszaninie reakcyjnej razem z oczyszczonymi komponentami maszynerii z *E. coli*. W związku z powyższym mam pytanie, czy zastosowanie gotowego kompleksu IscU-Fe oraz osobno IscU i żelaza może mieć wpływ na formowanie się centrum Fe-S a przyjemniej na kinetykę tego procesu. Chciałbym również zapytać, na jakim stopniu utlenienia żelazo jest właściwym substratem do formowania centrum. W procedurze odtwarzania centrum w układzie eukariotycznym Doktorantka wspomina o zastosowaniu żelaza Fe³⁺ (str. 105, chociaż na

Rycinie 33 zaznaczone jest żelazo Fe^{2+}), a w systemie bakteryjnym żelaza Fe^{2+} (str. 58). Być może jest to edytorska pomyłka.

W ostatniej serii doświadczeń Doktorantka badała transfer zrekonstruowanego centrum Fe-S z IscU do ferredoksyny (Fdx) i monotiolowej glutaredoksyny (GrxD). Badania te poprzedzone były uzyskaniem oczyszczonych form apo- obu docelowych białek akceptorowych. Doktorantka badała również wpływ na ten proces samego GrxD oraz białek opiekuńczych HscA/HscB. W wyniku przeprowadzonej próby transferu centrum 2Fe-2S do apo-Fdx (mieszanina reakcyjna zawierała: IscU, IscS, FAC, L-cysteinę, askorbinian sodu, GSH oraz 80 μ M apo-Fdx), Doktorantka uzyskała forme holo-Fdx. Badając specyficzność tej reakcji okazało się jednak, że brak IscU powoduje, że reakcja syntezy centrum Fe-S w obrębie Fdx jest wolniejsza i mniej wydajna. Z kolei dodanie do mieszaniny reakcyjnej (zawierającej IscU i pozostałe składniki) GrxD spowodowało znaczny przyspieszenie reakcji transferu, jak również bardziej wydajne tworzenie się holo-Fdx. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami literaturowymi, wskazującymi, że białka należące do rodziny glutaredoksyn monotiolowych są wymagane na etapie transferu centrów Fe-S z molekularnego rusztowania do docelowych białek akceptorowych. W dalszym ciągu Doktorantka postanowiła zweryfikować kontrowersyjne dane na temat roli białek opiekuńczych HscA i HscB w regulowaniu tempa reakcji transferu centrum 2Fe-2S do apo-Fdx. Dodanie systemu HscA/HscB do wcześniej opisanej mieszaniny spowodowało, że reakcja transferu Fe-S do apo-Fdx stała się znacznie wolniejsza i mniej wydajna. Doktorantka nie poprzestała na tej obserwacji ale postanowiła sprawdzić, co może być przyczyną przeciwstawnych wyników uzyskanych przez innych Autorów. Wykryła, że obserwowany przez niektórych Autorów efekt przyspieszenia formowania się centrum Fe-S może wynikać z obecności w mieszaninie reakcyjnej DTT, co nie odzwierciedla warunków fizjologicznych i jak wcześniej stwierdziła przyczynia się do generowania doświadczalnych artefaktów. Stąd pozostał już tylko jeden krok do sprawdzenia rekonstrukcji transferu centrum Fe-S do białka docelowego, którym tym razem była GrxD w oparciu o biosyntezę centrum Fe-S w obrębie IscU obejmującą tandem białek Fdx/FdxR, NADPH i białka opiekuńcze HscA/HscB. Finalnym wynikiem tych doświadczeń była obserwacja, że transfer centrum z IscU do GrxD ma miejsce tylko w obecności systemu białek opiekuńczych Hsc/HscB. Ta część realizowanych przez Doktorantkę badań wskazuje na jej naukową dociekliwość i dążenie do wyjaśnienia do końca kontrowersyjnych aspektów biogenezy centrów Fe-S i ich transferu do docelowych białek akceptorowych.

W odniesieniu do wszystkich doświadczeń rekonstrukcji centrum Fe-S i jego transferu do docelowych białek akceptorowych, przeprowadzonych w części doświadczalnej pracy doktorskiej, mam pytanie dotyczące stosowania przez Doktorantkę różnych związków i stężeń żelaza (od 10 μ M

do 400µM) w mieszaninach reakcyjnych. W szerszym kontekście jest to prośba o komentarz odnoszący się do potencjalnej regulacji biogenezy i transferu centrów Fe-S *in vivo* w zależności od biodostępności żelaza w komórkach eukariotycznych, w tym w komórkach ssaków. Mam tu na myśli nie tylko niedobór ale i nadmiar żelaza, charakterystyczne dla wielu patologii. Zagadnienie to jest istotne, moim zdaniem, również z względu na zależności między żelazem jako elementem oksydoredukcyjnego *status quo* w komórce i glutaredoksynami, które biorą udział w biogenezie centrów Fe-S i funkcjonują jako enzymy antyoksydacyjne (Mühlenhoff et al., Biol Chem. 2020; 401(12):1407-1428).

Rozdział 5. **DYSKUSJA** jest wyczerpujący, bardzo dobrze zredagowany i poprowadzony. Zwracają uwagę liczne odniesienia do wyników, które, co prawda, nie znalazły się w pracy doktorskiej, które jednak zawarto w artykule opublikowanym w prestiżowym czasopiśmie Journal of the American Chemical Society, którego pani mgr Małgorzata Kleczewska jest współautorem. Dotyczą one przede wszystkim identyfikacji miejsca wiązania jonu żelaza (Fe²⁺) w monomerycznej formie ISCU. Miały one niewątpliwie wpływ na przeprowadzenie niektórych doświadczeń w pracy doktorskiej i przyczyniły się do użycia w mieszaninach reakcyjnych kompleksu IscU-Fe.

Na koniec recenzji chciałbym wyrazić moje duże uznanie dla warsztatu metodycznego użytego przez Doktorantkę w trakcie realizacji jej rozprawy doktorskiej i skrupulatnie opisanego w rozdziałach 6. **MATERIAŁY** i 7. **METODY**. Zastosowane metody uderzają wszechstronnością. Obejmują one analizy ewolucyjne a w sferze *stricte* laboratoryjnej różnorodnie techniki biologii molekularnej, metody biochemiczne, pomiar aktywności enzymatycznej, pracochłonne metody oczyszczania białek, precypitacji kompleksów białkowych, spektroskopię dichroizmu kołowego. Poza wspomnianą współpracą z dr D'Autréaux, również rozdziały 6. **MATERIAŁY** i 7. **METODY** podkreślają międzynarodowy charakter realizowanych badań, zważywszy na to, że szereg wektorów plazmidowych niezbędnych do ekspresji białek eukariotycznych otrzymano w ramach współpracy naukowej od członków wiodących w dziedzinie biogenezy centrów Fe-S zespołów na Uniwersytecie Winconsin-Madison i Uniwersytecie w Marburgu.

Na podstawie dogłębnej analizy stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa 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 do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o nadanie stopnia doktora w reprezentowanej dyscyplinie dla Pani mgr

Małgorzaty Kleczewskiej. Wnioskuje również do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kleczewskiej, zgodnie z Regulaminem wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Biotechnologia. W uzasadnieniu tego wniosku, pragnę podkreślić, że Doktorantka poruszyła w rozprawie kilka wątków funkcjonalnych biogenezy centrów Fe-S i ich transferu do docelowych białek akceptorowych i dokonała porównania bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 funkcjonujących w biogenezie centrów żelazo-siarkowych, wykazując ich uderzające podobieństwo. Ponadto doświadczenia przeprowadzone w ramach rozprawy cechuje „żywa reakcja” na bieżące dokonania innych Autorów w zakresie badań nad biogeneza centrów Fe-S polegająca na stosownej modyfikacji planów doświadczalnych. Opracowany przez Doktorantkę model badawczy *in vitro* otwiera nowe możliwości badania wydajności procesów syntezy oraz transferu centrów Fe-S oraz wpływu mutacji genowych, które potencjalnie zaburzają interakcje pomiędzy białkami uczestniczącymi w procesie biogenezy. Na koniec, godnym podkreślenia elementem pracy jest jej bogata i wszechstronna metodyka niezbędna do uzyskania wyników oraz w całym tego słowa znaczeniu międzynarodowy charakter badań.

Jastrzębiec, 31 lipca 2023

Prof. dr hab. Paweł Lipiński
Zespół Biologii Molekularnej Żelaza
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN

”