

Prof. dr hab. Agnieszka Chacińska  
Kierownik Laboratorium Biogenezy Mitochondriów  
Międzynarodowy Instytut  
Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Warszawa, 08.05.2016

## Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pani mgr Julii Magdaleny Majewskiej

**„Analiza strukturalno-funkcjonalna oddziaływania desulfurazy cysteinowej Nsf1(Isd11)  
z białkami uczestniczącymi w syntezie centrów żelazowo-siarkowych”**

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Marszałka

w katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej

Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego

i Uniwersytetu Medycznego

Centra żelazowo-siarkowe stanowią grupy prostetyczne wielu białek, biorących udział w ważnych procesach na terenie całej komórki, często z udziałem transferu elektronów. Etapy oraz enzymy katalizujące procesy syntezy centrów żelazowo-siarkowych, występują zarówno w organizmach prokariotycznych, jak również eukariotycznych. Mechanizmy te są stosunkowo mocno, lub nawet bardzo mocno, zachowane ewolucyjnie, jednak dalekie od pełnego zrozumienia. W kontekście fundamentalnego znaczenia procesu syntezy centrów żelazowo-siarkowych oraz zaburzeń, jakie występują w wielu chorobach ludzkich, dokładne jego poznanie pozostaje ważnym zadaniem badawczym. Właśnie tej tematyki badawczej dotyczy przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Julii Majewskiej. Celem rozprawy doktorskiej mgr Julii Majewskiej było pogłębienie wiedzy na temat oddziaływań głównych białek odpowiedzialnych za syntezę centrów żelazowo-siarkowych w mitochondriach oraz poznanie znaczenia tych oddziaływań i ich dynamiki dla funkcjonowania zarówno szlaku jak i całej komórki. Badanie opisane w rozprawie doktorskiej są wykonane z użyciem prostego eukariotycznego organizmu modelowego, drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

## Formalny opis rozprawy oraz ocena strony edytorskiej

Rozprawa doktorska jest napisana po polsku. Główna część pracy liczy prawie 100 stron i ma strukturę dość klasyczną z podziałem na Streszczenie, Wstęp, Materiały, Metody, Wyniki oraz Dyskusję wraz z podsumowaniem. Rozprawę kończy obszerny i wyczerpujący spis literatury. Streszczenie w sposób syntetyczny przedstawia opisane w rozprawie wyniki. Dość obszerny wstęp rozprawy wprowadza w zagadnienia biologii centrów żelazowo-siarkowych, ich roli w komórce oraz syntezy z uwzględnieniem ewolucyjnych podobieństw i różnic. Wstęp jest opatrzony wieloma przejrzystymi oraz estetycznymi rycinami. Niektóre z rycin prezentowałyby się lepiej, gdyby zostały powiększone w całości, lub tylko napisy, zajmując całe miejsce przeznaczone dla nich na stronie (np. Rycina 2). Brakuje również jasnego przedstawienie nazewnictwa (np. w postaci tabelki), w szczególności gdy dyskutowane są białka z różnych organizmów. Czasami też zdarzają się niejasne zdania. Zdanie ze środka strony 17 zaczynające się „Struktura frataksyny została zachowana w toku ewolucji, natomiast badania...” pozostaje dla mnie słabo niezrozumiałe. To powoduje, że wstęp, który jest dobrym podsumowaniem wiedzy czyta się nie bez pewnych trudności.

Materiały i Metody są obszerną częścią pracy, i dają wyobrażenie o różnorodności technik używanych przez doktorantkę w czasie badań. W badaniach doktorantka użyła znaczącej liczby różnych konstruktów i wariantów białek, które opisała w Metodach. Dla jasności polecałabym umieszczenie ich w tabeli, która ułatwiłaby czytelnikowi oraz w szczególności członkom grupy, zainteresowanym kontynuacją badań, w szybkim rozeznaniu się w pochodzeniu i charakterystyce plazmidów, z uwzględnieniem referencji do oryginalnej publikacji. W obecnej formie nie jest dla mnie jasne, czy użyte wektory oraz ich warianty zostały opublikowane. Doktorantka na początku podrozdziału pt. „Wektory plazmidowe” wyjaśnia, że wektory zostały przygotowane w ramach współpracy z dr Schilke z University Wisconsin-Madison. Czy to oznacza, że autorem wszystkich konstruktów jest dr Schilke, czy może obie autorki brały udział w ich konstrukcji? Rozprawa doktorska jest pracą jedno-autorską i złotym standardem jest opisanie udziału w wykonaniu materiałów (podobnie jak eksperymentów pomocniczych wykonanych przez innych badaczy) w sposób niepozostawiający wątpliwości. Rozdział Metody został dobrze przygotowany i nie mam tu żadnych uwag krytycznych.

Wyniki są opisane w sposób logiczny i przejrzysty. Ryciny prezentujące wyniki eksperymentalne są zasadniczo czytelne, choć podobnie jak w przypadku Ryciny 2, mogłyby mieć zwiększone czcionki bez zabierania więcej miejsca. Słowo „inwariantne” nie powinno się znaleźć w tekście napisanym w języku polskim. Dyskusja jest obszerna i wskazuje na znajomość tematyki oraz umiejętność umieszczenia bogatych danych eksperymentalnych otrzymanych przez doktorantkę w szerszym kontekście. W części dyskusji znajdują się trzy ryciny, z których jedna w sposób graficzny przedstawia podsumowanie otrzymanych wyników.

Jako kolejną drobną wadę natury edytorsko-formalnej uznaję brak wyraźnego stwierdzenia, czy i które wyniki będące częścią rozprawy doktorskiej są opublikowane. Fakt, czy wyniki przeszły rygorystyczny proces tzw. „peer review” jest istotną informacją, którą naprawdę warto się pochwalić. Ta krytyka nie przeszkadza w stwierdzeniu, że przedstawiona rozprawa doktorska prawidłowo zredagowana oraz dopracowana graficznie.

### **Ocena merytoryczna**

Wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej to spójna tematycznie analiza etapów syntezy centrów żelazowo-siarkowych oraz oddziaływań białek skupionych wokół białka-rusztowania Isu1. Isu1 oddziałuje z serią białek, które są odpowiedzialne za dostarczenie siarki oraz żelaza do Isu1. Do tych białek należy kompleks desulfurazy cysteinowej Nfs1(Isd11) oraz Yfh1 (frataksyna). Struktury większości białek, które były obiektem tej pracy, były rozwiązane dla organizmów innych niż *S. cerevisiae*. Na bazie dostępnych danych Doktorantka przeprowadziła modelowanie struktur białek drożdży w kompleksach w celu wytypowania tych części białek, które są miejscem ich miejscem kontaktu. Następnie przeprowadziła biochemiczne badania oddziaływań, jak również ich znaczenia dla fizjologii komórki. Reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie Nfs1(Isd11) i Isu1 są zachowane ewolucyjnie i ich zmiana prowadzi do śmierci komórki na skutek braku tworzenia się kompleksu. Podobna strategia została użyta do analizy kompleksu Nfs1(Isd11)-Isu1-Yfh. Tu sytuacja była jednak bardziej skomplikowana, ponieważ reszty aminokwasowe w obrębie Nfs1 wytypowane jako ważne dla oddziaływań w tym kompleksie trójskładnikowym stanowią również sygnał dla ważnej do życia lokalizacji jądrowej. W związku z tym Doktorantka zastosowała pełny inwencji sposób dostarczenie drugiej kopii białka Nsf1 pozbawionego sekwencji sygnałowej, kierującej do mitochondriów zapewniając w ten sposób w pełni funkcjonalną jądrową kopię Nsf1 i tym samym możliwość badania znaczenie zmian dla interakcji mających miejsce w mitochondriach. W wyniku badań

znaleziono i udowodniono miejsce wiązania Yfh1. Ta interakcja nie jest niezbędna dla życia. W tym kontekście chciałabym przedyskutować z Doktorantką wynik, pozornie sprzeczny z powyższym i wskazujący, że reszty arginyiny Nfs1 odpowiedzialne za miejsce wiązania Yfh1 są jednak dla życia komórki niezbędne. Doktorantka zaproponowała w Dyskusji inną rolę, jaką może pełnić ten obszar. Czy może dochodzić w tym przypadku do ciekawej gry z kopią białka pozbawioną presekwencji, jakiegoś efektu dominującego? Czy sprawdzana była komórkowa lokalizacja tego wariantu?

Z wielu zaprezentowanych w pracy wyników najciekawszy to udowodnienie, że wiązanie Nfs1 (Isd11) oraz białka Jac1 - zaangażowanego w etap rozpoczynający przekazanie dojrzałych centrów do białek akceptorowych - do Isu1 wzajemnie się wykluczają. Doktorantka pokazuje to w przekonujący sposób w oparciu o modelowanie struktur, mutagenezę i biochemiczną analizę oddziaływań. To odkrycie rzuca nowe światło na dynamikę i wzajemną współzależność etapów syntezy centrów żelazowo-siarkowych.

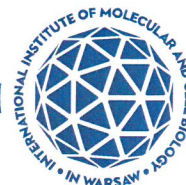
Bardzo wysoko oceniam wyniki uzyskane przez Doktorantkę, zarówno ich jakość jak i wartość naukową. W przypadku zmiany migracji zmutowanego wariantu Yfh1 (Rycina 19 i 20) należałoby pokazać markery wielkości? Zmiana wydaje się być dość duża. Czy możliwa jest inna interpretacja, np. zmiana w modyfikacjach post-translacyjnych?

Chciałabym skorzystać z mojej pozycji Recenzenta i poddać pod dyskusję dość enigmatyczną sprawę metabolizmu/dostarczania żelaza do mitochondriach oraz w szerszym kontekście wzajemnego dialogu między różnymi przedziałami komórkowymi. We wstępie do pracy nie ma podanych zbyt dużo informacji na ten temat. Ta problematyka wydaje mi się interesująca i ważna, ponieważ to zaburzenia w stężeniu żelaza są jednym z głównych mianowników patologii związanych z defektami w syntezie centrów żelazowo-siarkowych.

Przedstawione powyżej uwagi są zdeterminowane moją chęcią zaspokojenia ciekowości, poznania opinii Doktorantki, dyskusji i nie mają wpływu na moją wysoką ocenę naukowej wartości pracy. Zarówno wartość merytoryczną rozprawy, znaczenie uzyskanych wyników i kompetencje Doktorantki oceniam bardzo dobrze.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska p. mgr Julii Majewskiej to obszerna i wszechstronna analiza kompleksów tworzonych przez białka zaangażowane w syntezę centrów żelazowo-siarkowych.



Wartość merytoryczna pracy jest bardzo wysoka. Moje drobne uwagi krytyczne dotyczą głównie części edytorskiej pracy.

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Dorobek naukowy kandydatki w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie pracy i dopuszczenie pani mgr Julii Magdaleny Majewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Bazując na wysokiej jakości badań opisanych w rozprawie, chciałabym zgłosić rozprawę p. mgr Julii Magdaleny Majewskiej do wyróżnienia przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

A. Chacińska

Agnieszka Chacińska