



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dziekanaat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 9.06.2016

L.dz. nr 21/2016

KRAKÓW, 8 CZERWCA 2016

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
PROF. DR HAB. ARTUR OSYCZKA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Manickiego pt: „Biochemiczna rekonstrukcja kompleksów białkowych zaangażowanych w mitochondrialną biogenezę centrów żelazo-siarkowych”

Centra żelazo-siarkowe stanowią jedną z podstawowych i najbardziej rozpowszechnionych w białkach grup kofaktorów metalicznych. Z ich udziałem zachodzą fundamentalne dla biologii komórki procesy, takie jak transfer elektronu w układach bioenergetycznych. W poznaniu działania centr żelazo-siarkowych (FeS) istotne są dwa obszary wiedzy. Obszar pierwszy obejmuje poznanie właściwości fizykochemicznych tych centr, ich interakcji z otoczeniem białkowym i z sąsiadującymi kofaktorami w łańcuchach kofaktorów. Obszar drugi, to poznanie biogenezy powstawania białek zawierających centra FeS, a w szczególności procesów związanych z formowaniem się tych centr i ich inkorporacją do białek. Właśnie w ten drugi nurt badań wpisuje się przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pana mgr Mateusza Manickiego. W pracy tej mgr Manicki stawia sobie za cel zmapowanie oddziaływania pomiędzy białkami rusztowania molekularnego (Isu1), desulfurazy cysteinowej (Nfs1) i frataksyny (Yfh1), stanowiących rdzeń kompleksu syntezy centr FeS. Jest to bardzo aktualne i istotne zagadnienie o fundamentalnym znaczeniu poznawczym dla obszarów z dziedziny biochemii i biofizyki, w tym w szczególności – bioenergetyki molekularnej.

Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Marszałka, w renomowanym zespole badawczym zasłużonym w odkrywaniu tajników natury związanych z procesami biogenezy białek zawierających centra żelazo-siarkowe. W 2012 roku miałem przyjemność zapoznać się z osiągnięciami prezentowanymi w ramach innego doktoratu związanymi z oddziaływaniem pomiędzy białkiem Isu1 a białkiem typu Jac1. Fakt, iż obecna rozprawa dotyczy oddziaływań związanych z wcześniejszymi etapami całego procesu biogenezy, wskazuje na systematyczną i systemową aktywność zespołu ukierunkowaną na kompleksowe wyjaśnienie wszystkich aspektów biogenezy tych białek.

Rozprawa zredagowana została w języku polskim, na 129 stronach maszynopisu. Układ tezy doktorskiej jest klasyczny i opiera się o podział na 7 rozdziałów uzupełnionych nienumerowanym Streszczeniem i Celem pracy.

Pierwszy rozdział, wstępny, jest przejrzystym i zwięzłym wprowadzeniem o charakterze przeglądu literaturowego opisującym współczesny stan wiedzy związany w wybranych

UL. GRONOSTAJOWA 7, POK. A027

30-387 KRAKÓW

TEL: +48 (12) 664 6348

EMAIL: ARTUR.OSYCZKA@UJ.EDU.PL

zagadnieniami z obszaru struktury i funkcji białek zawierających centra FeS, ich biogenezy, a także oddziaływań pomiędzy białkami. Należy zwrócić uwagę, że w rozdziale tym podkreślone są niewyjaśnione dotąd zagadnienia, które bezpośrednio nawiązują do celów pracy. Sam cel umieszczony jest w formie krótkiego paragrafu zatytułowanego Cel pracy na osobnej stronie umieszczonej bezpośrednio po wstępie. Jest on jednakże wystarczająco informatywny i precyzyjny, niosąc w sobie elementy streszczenia. Bardzo podoba mi się precyzja i staranność z jaką przygotowane zostały rozdziały trzeci Materiały, oraz czwarty Metody. Najważniejszymi rozdziałami rozprawy stanowiącymi o jej wyjątkowej wartości w procesie poznawania uwarunkowań powstawania centr FeS są kolejne rozdziały obejmujące Wyniki oraz Dyskusję. Wyniki podzielone są na podrozdziały zaopatrzone w bardzo informatywne tytuły wypunktowujące najważniejszą ideę i myśl przewodnią danego podrozdziału, co nadaje przejrzystość i ułatwia śledzenie samych wyników. Poziom dyskusji, jej wieloaspektowość, wnikliwość i precyzja sformułowań wskazują na dojrzałość naukową oraz wysoką erudycję Doktoranta. Bardzo ciekawa i dogłębna analiza porównawcza własności strukturalnych i enzymatycznych badanych kompleksów oddziałujących powierzchniami natywnymi bądź zmodyfikowanymi przez mutagenезę punktową umiejętnie dopasowuje interpretację wyników doświadczalnych z przewidywaniami opartymi na modelowaniu i danymi literaturowymi. Doktorant nawiązuje przy tym do najnowszych publikacji, w tym również pod koniec rozdziału szczegółowo omawia pracę opublikowaną w tym roku w trakcie przygotowywania tekstu rozprawy.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych prezentowanych w Wynikach i Dyskusji zaliczyć należy:

1. Wykazanie, że frataksyna wiąże się do uprzednio uformowanego kompleksu białek Isu1 i Nfs1, a nie oddziałuje z żadnym z tych białek osobno.
2. Zdefiniowanie za pomocą ukierunkowanej mutagenезy reszty kwasów asparaginowego i glutaminowego na powierzchni Yfh1, oraz trzech arginin na powierzchni Nfs1 odpowiedzialnych za molekularne oddziaływanie Yfh1 i Nfs1.
3. Wykazanie, że tryptofan na powierzchni białka Yfh1 oraz motyw PVK na powierzchni Isu1 są odpowiedzialne za molekularne oddziaływanie Yfh1 i Isu1.
4. Zaproponowanie mechanizmu, w którym utworzenie się kompleksu Isu1 i Nfs1 skutkuje uformowaniem się kieszeni wiążącej frataksynę, a jej przyłączenie skutkuje zwiększeniem aktywności enzymatycznej Nfs1. Elementem tego mechanizmu jest intrygująca hipoteza zakładająca rolę motywu PVK z białka Isu1 jako przełącznika allosterycznego, który wpływałby bezpośrednio na konformację mobilnej pętli desulfurazy kierując ją w stronę Isu1.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi ciekawe spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

1. Czy badany i opisywany w pracy szlak syntezy centrów FeS dotyczy konkretnego typu klastra, czy jest uniwersalny? Co decyduje o stereo-specyficzności w powstawaniu wielu typów centrów FeS?
2. Praca opisuje powierzchnie oddziaływań zaangażowane w tworzenie się specyficznych kompleksów białkowych. Ciekawy jestem natomiast opinii

Doktoranta na temat dynamiki formowania się tychże kompleksów? Jak długo one trwają, co decyduje o wymianie kompleksów w trakcie sekwencji proponowanej na Rys. 33. Co decyduje o tym, że kompleksy się rozpadają. Częściowo jest to zaadresowane na końcu dyskusji, ale chciałbym zachęcić Doktoranta do szerszych dywagacji na ten temat.

3. Czy badana była obecność uformowanego klastra FeS w kompleksie Yfh1-Isu1-Nfs1, bądź Isu1-Jac1, metodami spektroskopowymi? Czy są jakieś dane literaturowe na ten temat? Czy wiadomo coś na temat własności tychże centr w kompleksach, na ile są różne/podobne od własności centr w białkach docelowych?
4. Na ile, zdaniem Doktoranta, badanie oddziaływań w oparciu o metodę precypitacji, w której jedno z oddziałujących białek (Yfh1) jest zfuzjowane z cząsteczką S-Transferazy Glutationu i unieruchomione na złożu agarowym, odpowiada warunkom naturalnym?
5. Czy wprowadzenie mutacji punktowych w rejonach powierzchni białek odległych od proponowanych w pracy domen reakcyjnych będzie miało widoczny efekt na oddziaływanie między białkami? Czy wiadomo coś na ten temat?
6. W świetle stosowanych w pracy podstawień w głównej mierze alaninowych (a także inwersji ładunku) ciekawe mogłyby być efekty podstawień na inne grupy funkcyjne. Czy były prowadzone badania w tym kierunku. Jeśli nie, co Doktorant mógłby zaproponować?
7. Mając na względzie propozycję zamieszczoną na stronie 68 (górny akapit) chciałbym zachęcić Doktoranta do szerszej spekulacji na temat molekularnego sposobu w jakim lizyna 136 z Isu1 mogłaby wpływać na hamowanie aktywności desulfurazy.

Mam też pytanie: czy wyniki przedstawione na Ryc. 11 B, C; 14 B, 18 A, 20, 23 B, 24, 26 A pochodzą z jednej serii pomiarów, czy też są dla nich dostępne słupki błędów?


Chciałbym podkreślić bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy, tak w aspekcie językowym jak i graficznym (m.in. bardzo staranne i eleganckie ryciny i schematy). W efekcie jest niewiele miejsc, w których można autorowi zaproponować wprowadzenie korekt:

1. „Rycina” 2 na str 8 to w zasadzie „Schemat” reakcji.
2. Str13 – 1 wers w legendzie do Ryc. 5 – powinno chyba być „białka rusztowania molekularnego”
3. Str 25, podrozdz. 2.1 wszystkie E. coli powinny być italicem., tak samo E.coli na str 85
4. Na str 26 od razu pojawiają się plazmidy kodujące potrójne mutacje, a nie ma informacji wyjaśniającej czy są też mutacje pojedyncze
5. Str 26, wers 4 od dołu powinno być „kierującej go”
6. Str 32, wers 5 „dedykowanymi”
7. Str 57, Ryc 14 C sformułowanie „schematyczne przedstawienie wyników” nie jest zbyt trafne, jest to raczej „schemat proponowany w oparciu o uzyskane wyniki”

8. Rozdział dyskusja zyskałby w moim odczuciu na przejrzystości gdyby wprowadzić tematyczne podrozdziały odpowiednio zatytułowane.
9. Powinno się wyjaśnić co oznacza symbol α na schemacie na str 92.
10. Na str. 108. w cytowaniu poz. 162 i 166 z 2016 roku dobrze byłoby umieścić numer DOI celem ułatwienia odszukania pracy w bazie danych (domyślam się że numery stron i vol. były w trakcie pisania rozprawy niedostępne).

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, że Pan mgr Mateusz Manicki przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie wyników cyklu precyzyjnych, przemyślanych i znakomicie przeprowadzonych prac badawczych. Wyniki te są nowatorskie i przyczyniają się do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów oddziaływania typu białko-białko leżących u podstaw fundamentalnych procesów warunkujących biogenezę białek zawierających centra FeS. Ważna część tych wyników została opublikowana na łamach artykułu w renomowanym czasopiśmie *Journal of Biological Chemistry*, gdzie Doktorant występuje w charakterze pierwszego autora. Ponadto Doktorant jest współautorem w dwóch innych pracach (w *BBA-Mol.Cell.Res* oraz *Mol. Biol. Evol.*).

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi *Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym* do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Walory samej rozprawy, w szczególności naukowa waga osiągniętych w jej ramach wyników, sprawiają że rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą. Gratulując Doktorantowi tak wartościowej pracy zwracam się z prośbą do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Mateusza Manickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Artur Osyczka