

Dr hab. Marcin Nowotny

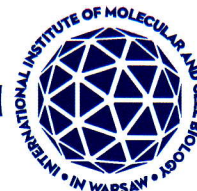
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Wojciecha Delewskiego „Molekularny mechanizm oddziaływania domeny-J białka Jac1 z partnerskim Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych”.

Opisane w rozprawie badania dotyczą specyficzności oddziaływania dwóch białek zaangażowanych w proces biogenezy centrów żelazo-siarkowych (FeS). Centra te pojawiły się w ewolucji wcześniej i do dziś, również w złożonych organizmach, wchodzą w skład struktury białek pełniąc istotne funkcje w przekazywaniu ładunków, katalizie czy przetwarzaniu informacji genetycznej. U eukariontów centra FeS powstają w mitochondriach, a ich rola w białkach łańcucha oddechowego jest szczególnie ważna. Znaczenie tych centrów dodatkowo zwiększa fakt, że defekty w ich składaniu prowadzą do szeregu patologii u ludzi. Proces biogenezy centrów FeS jest ciekawy i złożony. W proces ten zaangażowane jest wiele kompleksów białkowych, które zwierają między innymi białka szoku cieplnego. Mechanizm działania tych kompleksów nie jest szczegółowo poznany. Przedstawiona Rozprawa skupia się na poznaniu mechanizmu specyficzności oddziaływania między białkami występującymi w *S. cerevisiae* i zaangażowanymi w transfer centrum FeS: Ssq1 z rodziny Hsp70 oraz Jac1 zawierającym domenę J (tzw. białko JDP). Rolą domeny J jest oddziaływanie z Ssq1 i włączanie aktywności ATPazy białka opiekuńczego. To z kolei prowadzi do przekazania centrum FeS do białka docelowego.

Zwięzły wstęp pracy w przejrzysty sposób przedstawia zarówno proces biogenezy centrów FeS, jak i białka z ten proces zaangażowane. Sporo uwagi poświęcone jest aspektom ewolucyjnym. Wstęp dobrze nakierowuje czytelnika na problem badawczy i uzasadnia jego podjęcie. Ryciny są dobrze przygotowane i pomagają w zrozumieniu tematu badań.

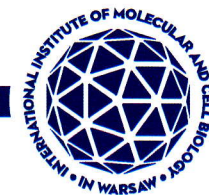
Podjęte przez Doktoranta zagadnienie jest istotne. Oddziaływanie Ssq1-Jac1 jest stosunkowo słabo zbadane. W poszczególnych organizmach różne białka Hsp70 oraz JDP oddziałują ze sobą w procesie transferu centrum FeS. Zagadnienie to ma to więc istotny aspekt ewolucyjny. Dlatego w mojej opinii trafnym pomysłem było porównanie oddziaływań



Ssq1-Jac1 z *S. cerevisiae* (*Sc*) z analogicznym oddziaływaniem w *S. pombe* (*Sp*), w którym brak jest wyspecjalizowanego białka Hsp70, a w biogenezę centrów FeS zaangażowane jest wielofunkcyjne/generalne białko opiekuńcze mtHsp70.

Jakość merytoryczną badań własnych Doktoranta oceniam wysoko. Doktorant osiągnął założony cel i zidentyfikował determinanty sekwencyjne/strukturalne specyficzności oddziaływania Ssq1-Jac1. Doktorant zastosował trzy różne podejścia doświadczalne, aby zbadać znaczenie zidentyfikowanego wcześniej motywu HPD w oddziaływaniu Ssq1-Jac1 (dla *Sc*) oraz mtHsp1-Jac1 (dla *Sp*). Substytucje w tym motywie były częściowo tolerowane dla *Sc* i całkowicie zaburzały funkcję kompleksu dla *Sp*. Na podstawie modeli strukturalnych i analizy sekwencji Doktorant stwierdził, że w białku Jac1 występują reszty naładowane i wykazał ich znaczenie dla oddziaływania. W Jac1 R37 oraz R41 grają główną rolę w mediowaniu oddziaływania Jac1-Ssq1. W Ssq1 reszty o komplementarnych ładunkach D246 oraz E253 są kluczowe dla tej interakcji. Znaczenie tych reszt Ssq1 Doktorant potwierdził metodą sieciowania chemicznego z wykorzystaniem białka Jac1 z nienaturalnym tworzącym połączenia kowalencyjne aminokwasem. Konkluzja płynąca z tych badań jest taka, że w oddziaływaniu bierze udział sieć oddziaływań elektrostatycznych, która w ewolucji ulega modyfikacjom wpływając na specyficzność wiązania między poszczególnymi białkami w danym organizmie.

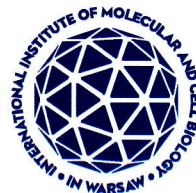
W swoich badaniach Doktorant zastosował wachlarz metod od testów *in vivo* – doświadczeń genetycznych w drożdżach *S. cerevisiae* oraz *S. pombe*, przez biochemię białek, testy enzymatyczne, badanie oddziaływań białko-białko i metody biofizyczne. Wiele doświadczeń zostało zaprojektowanych na podstawie informacji o strukturze białek. Uznanie wzbudza również fakt zastosowania metody wprowadzania nienaturalnych aminokwasów do sekwencji białka, która jest technicznie trudna. Białka te zostały użyte w doświadczeniach sieciowania chemicznego, których celem było potwierdzenie udziału wytypowanych reszt aminokwasowych w oddziaływaniach białkowych. Szerokie podejście doświadczalne z użyciem komplementarnych metod pozwoliło Doktorantowi przekonująco udokumentować swoje odkrycia.



W pracy zwraca uwagę staranność planowania doświadczeń, w tym uwzględnienie niezbędnych doświadczeń kontrolnych. Doktorant testował na przykład integralność strukturalną substytucyjnych wariantów białek przed ich użyciem w doświadczeniach biochemicznych. Inny przykład to potwierdzenie składu kompleksów sieciowanych chemicznie metodą spektrometrii mas. Trzeci przykład to zweryfikowanie, że obecność wielofunkcyjnego białka opiekuńczego Ssc1 w Sc nie wpływa na uzyskane wyniki. Przykłady te potwierdzają, że Doktorant bardzo rzetelnie i w sposób dobrze przemyślany prowadził swoje doświadczenia.

Główna opisana w Rozprawie trudność techniczna, na którą natknął się Doktorant, to niemożność oczyszczenia białka Isu1 z *S. pombe*. Doktorant był zmuszony używać w swoich doświadczeniach białka z *S. cerevisiae*. Doktorant charakteryzował biochemicznie aktywność ATPazy Hsp70 w obecności Jac1 oraz Isu1, czego celem było wykazanie różnic tej aktywności dla wariantów białka Jac1 z substytucjami reszt aminokwasowych. Jak sam wskazuje, użycie w tych doświadczeniach kombinacji białek z dwóch różnych gatunków drożdży może być powodem obserwowanych różnic aktywności. Budzi uznanie, że Doktorant poszukiwał rozwiązania tego problemu przez oczyszczenie białka Isu1 z innego grzyba: *C. thermophilum* (Ct) i jego wykorzystaniu w połączeniu z pozostałymi białkami kompleksu z *S. cerevisiae* i *S. pombe*. Niemniej jednak tutaj również międzygatunkowe mieszaniny białka mogą zaburzać wyniki. Jest na przykład możliwe, że białko Ct jest ewolucyjnie bliższe białku Hsp70 z *Sp* niż *Sc* i stąd skuteczniej go aktywuje. Proszę Doktoranta o przedyskutowanie, jakie inne doświadczenia kontrolne można wykonać, aby wykluczyć te komplikacje. W tym kontekście pomocne byłoby również przedstawienie w Rycinie 9 grzyba *C. thermophilum* w drzewie filogenetycznym oraz przyrównania sekwencji aminokwasowych białek Isu1 ze wszystkich trzech gatunków.

Zwraca uwagę, że w niektórych doświadczeniach brak jest słupków błędów oraz wartości tych błędów dla parametrów kinetycznych (np. Rycina 13 B, C). Prosiłbym o wyjaśnienie. W pracy zabrakło mi przyrównania pełnych sekwencji białek Jac1. W Rycinie 17 pokazano jedynie bardzo krótki fragment sekwencji, który nie pozwala na ocenę podobieństwa tych białek.



Dyskusja opisuje interpretację wyników w szerszym kontekście ewolucyjnym. Jest wyczerpująca i dojrzała. Ostatnia część pracy to opis materiałów i metod przygotowany dobrze i szczegółowo. Opis ten powinien umożliwić powtórzenie doświadczeń bez większych trudności. Praca jest napisana w zrozumiały sposób i poprawnym językiem. Od strony edytorskiej jest przygotowana bardzo starannie. Nie znalazłem żadnych większych pomyłek ani w rycinach ani w tekście. Z mniejszych pomyłek wskazałbym na literówkę w numeracji reszt w ostatniej linii rozdziału 3.7 (strona 42).

Doktorant jest współautorem dwóch prac. W pierwszej pracy mgr Wojciech Delewski jest dzielonym pierwszym autorem i opisuje ona znaczną część wyników z Rozprawy. Ukazała się ona w bardzo dobrym czasopiśmie Molecular Biology and Evolution. W drugiej pracy, opublikowanej w Journal of Biological Chemistry, Doktorant jest środkowym autorem.

Podsumowując, przedstawiona mi do oceny rozprawa opisuje badania naukowe na wysokim poziomie technicznym i merytorycznym. Stanowi ważny wkład w zrozumienie mechanizmu biogenezy centrów FeS. Uważam, że rozprawa spełnia warunki określone ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Delewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy, bardzo istotne pole badań oraz sukces publikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Dr hab. Marcin Nowotny