



Prof. dr. hab. Hanna Kmita  
kmita@amu.edu.pl

Poznań, 06.07.2023

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kleczewskiej  
pt. „Porównanie bakteryjnych i eukariotycznych systemów Hsp70 funkcjonujących w  
biogenezie centrów żelazo – siarkowych”

Prokariotyczne i eukariotyczne białka zawierające centra żelazo-siarkowe (Fe-S) pełnią w komórce kluczowe funkcje. Ich adekwatne funkcjonowanie wymaga skomplikowanego procesu biogenezy centrów Fe-S. W przypadku komórek eukariotycznych miejscem biogenezy centrów Fe-S są mitochondria, w których funkcjonuje jeden z trzech znanych systemów biogenezy; tj. maszyna ISC (ang. Iron-Sulfur Cluster), obecna także w komórkach bakteryjnych. O znaczeniu tego procesu dla funkcjonowania komórek świadczy fakt, iż w organellach pochodzenia mitochondrialnego, takich jak mitosomy czy hydrogenosomy, mimo utraty innych funkcji, biogeneza centrów Fe-S zostaje zachowana. Proces biogenezy centrów Fe-S przebiega podobnie w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych. Wyróżnia się w nim dwa odrębne, ale ściśle ze sobą sprzężone, etapy; tj. syntezę centrum Fe-S w obrębie wyspecjalizowanego białka tworzącego molekularne rusztowanie i przeniesienie centrum Fe-S z tego białka do białka docelowego. Dostępne dane wskazują, że krytyczną rolę w biogenezie centrów Fe-S odgrywają białka opiekuńcze Hsp70 oraz współpracujące z nimi białka pomocnicze J. Upośledzenie działania tych białek uznaje się za przyczynę śmiertelnych chorób człowieka, ale także skuteczny mechanizm przeciwdziałania zakażeniom bakteryjnym. Stąd, pełne poznanie roli białek Hsp i białek J w przebiegu i regulacji biogenezy centrów Fe-S może mieć istotne konsekwencje kliniczne.

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań  
tel. +48 61 829 5553

[biologia.amu.edu.pl](http://biologia.amu.edu.pl) [ibmib.amu.edu.pl](http://ibmib.amu.edu.pl)

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy to istotny przyczynek do osiągnięcia tego celu. Rozprawa ta powstała pod opieką prof. UG dr hab. Rafała Dutkiewicza, w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego), światowej klasy ośrodka badań nad molekularnymi i ewolucyjnymi mechanizmami funkcjonowania komórkowych białek opiekuńczych i pomocniczych.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kleczewskiej dotyczy porównania eukariotycznych i prokariotycznych białek Hsp70, zaangażowanych w proces biogenezy centrów Fe-S, w ramach maszynerii ISC, w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i bakterii *Escherichia coli*. Dlatego mgr Małgorzata Kleczewska skoncentrowała się na następujących zagadnieniach: (1) weryfikacja ewolucyjnego związku między białkami Hsp70 zaangażowanymi w mitochondrialną i bakteryjną biogenezę centrów Fe-S; (2) wyznaczenie powinowactwa tych białek Hsp70 do substratu w postaci ATP oraz współpracujących białek, tj. białka J i białka tworzącego molekularne rusztowanie; (3) rekonstrukcja formowania centrów Fe-S w mitochondrialnym i bakteryjnym białku tworzącym molekularne rusztowanie i (4) rekonstrukcja transferu centrów Fe-S z molekularnego rusztowania do białka docelowego przy wykorzystaniu białek bakteryjnych.

W przeprowadzonych badaniach mgr Małgorzata Kleczewska zastosowała szeroki wachlarz metod obejmujący klonowanie, ekspresję białek w komórkach *Escherichia coli*, oczyszczanie białek, pomiar aktywności enzymatycznej i monitorowanie oddziaływania oczyszczonych białek przy wykorzystaniu chromatografii i elektroforezy białek oraz charakterystykę białek i detekcję obecności centrów Fe-S za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego. Na podkreślenie zasługuje otrzymanie szeregu białek bakteryjnych i drożdżowych w stanie funkcjonalnym umożliwiającym monitorowanie ich aktywności i rekonstrukcję procesu składania i transferu centrów Fe-S. Nie ulega zatem wątpliwości, że opisane wyniki mgr Małgorzata Kleczewska uzyskała dzięki trudnym i pracochłonnym eksperymentom, przeprowadzonym dzięki starannemu, ale także pracochłonnemu i wymagającemu technicznej precyzji, przygotowaniu materiału badawczego.

Na podstawie zawartego w rozprawie przedstawienia i opracowania wyników, można sformułować następujące wnioski:

1. Potwierdzono, że w przypadku wąskiej grupy grzybów, w tym drożdży *S. cerevisiae*, podobnie jak u bakterii, występuje białko opiekuńcze Hsp70 wyspecjalizowane w biogenezie centrów Fe-S. Jednakże białka HscA (bakterie) i Ssq1 (drożdże) nie są ortologami, a punktem wyjścia powstania genu kodującego białko Ssq1 jest duplikacja genu kodującego mitochondrialne białko Hsp70.
2. Wykazano, że aktywność ATP-azowa białek HscA i Ssq1 jest porównywalna pod względem powinowactwa do ATP ( $K_m$ ), lecz w obecności białka pomocniczego J



(odpowiednio, HscB i Hsc20) i białka tworzącego molekularne rusztowanie (odpowiednio, IscU i Icu1/CtIsu1), jest ona wyższa w przypadku białka HscA.

3. Wykazano, że białko Ssq1 ma wyższe niż białko HscA powinowactwo do białka tworzącego molekularne rusztowanie i swoistego białka pomocniczego typu J.
4. Opracowano wydajną metodę rekonstrukcji formowania centrów Fe-S w obrębie mitochondrialnego białka tworzącego molekularne rusztowanie (CtIsu1), umożliwiającą badanie transferu centrów Fe-S z molekularnego rusztowania do białek docelowych.
5. Opracowano wydajną procedurę rekonstrukcji centrów Fe-S w obrębie bakteryjnego białka tworzącego molekularne rusztowanie, wykorzystując NADPH oraz system białek ferredoksyna/reduktaza ferredoksyny, w nieobecności DTT, eliminując w ten sposób niefizjologiczne skutki działania tego ostatniego.
6. Opracowano skuteczną procedurę rekonstrukcji transferu centrów Fe-S z bakteryjnego molekularnego rusztowania (patrz p. 5) do białka docelowego (GrxD; glutaredoksyna monotiolowa), w obecności białek HscA i HscB, które są kluczowymi regulatorami szybkości tego procesu.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez mgr Małgorzatę Kleczewską dostarczyły istotnych informacji dotyczących działania maszynerii ISC oraz umożliwiły przeprowadzenie *in vitro* procesu rekonstrukcji formowania centrów Fe-S i ich transferu. Zatem, przyczyniają się one do zwiększenia wiedzy dotyczącej molekularnych podstaw działania maszynerii ISC, co ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia skutków jej defektów, także w kontekście zdrowia człowieka i ewentualnych rozwiązań aplikacyjnych. Warto w tym miejscu dodać, że wyniki dotyczące analizy filogenetycznej i charakterystyki białek HscA i Ssq1 oraz mechanizmu tworzenia centrum Fe-S w obrębie białka molekularnego rusztowania, jak i zastosowane podejście eksperymentalne zostało opublikowane w czasopiśmie z listy JCR (1/8 oraz 17/26 i 2/4). Doktorantka jest także jednym z dwóch autorów pracy przeglądowej dotyczącej białek opiekuńczych zaangażowanych w biogenezę Fe-S i opublikowanej także w czasopiśmie z listy JCR.

Rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kleczewskiej ma klasyczną formę i obejmuje Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Spis treści, Wstęp, Cel pracy, Wyniki, Dyskusję, Materiały, Metody i Bibliografię obejmującą 260! pozycji. Bardzo pozytywnie oceniam merytoryczną zawartość pracy, jednak muszę zaznaczyć, że zawiera ona błędy redakcyjne i językowe oraz niestety nieścisłości i niezręczności terminologiczne. Za najbardziej istotne usterki uznaję: (1) Streszczenie: mtHsp70 nie może być przodkiem bakteryjnego wielofunkcyjnego białka Hsp70 DnaK; (2) Wstęp: oddziaływania allosteryczne nie mogą być rozpatrywane w kontekście domen danego białka; poza tym część ta zawiera liczne powtórzenia i elementy wyników analizy filogenetycznej; (3) Cel pracy: sformułowany bardzo

ogólnie; (4) Wyniki: Menten była kobietą!; (5) Dyskusja: zawiera wiele istotnych informacji i ciekawe pytania badawcze, jednak nie koncentruje się w wystarczającym stopniu na otrzymanych wynikach; (5) Bibliografia: zawiera powtórzenia cytowanych prac, a w cytowaniach pojawiają się błędy; (6) brak Podsumowania, chociaż jego elementy można odnaleźć we Wstępie i w Dyskusji i (7) stosowanie w różnych częściach pracy określenia „dedykowany”.

Byłabym także wdzięczna za uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Skoro większość eukariontów, w tym ludzie, ma jedno, wielofunkcyjne mitochondrialne białko Hsp70, zaangażowane także w biogenezę centrów Fe-S, to czy zastosowanie jako modelu organizmów posiadających białko Hsp70 wyspecjalizowane do udziału w tym procesie, tj. bakterii i drożdży *S. cerevisiae*, jest dobrym rozwiązaniem?
2. Dlaczego w przypadku wyznaczania  $K_m^{ATP}$  dla białka Ssq1 uznano, że konieczne jest zwiększenie szybkości reakcji (poprzez dodanie białka Mge1)? Czy spodziewano się, że zwiększenie szybkości reakcji wpłynie istotnie na wartość  $K_m^{ATP}$ ?
3. Na jakiej podstawie dobierano stężenie składników do badań kinetycznych? I w jakim stopniu wyznaczone wartości  $K_m$  zostały wykorzystane w dalszych badaniach?
4. W opisie eksperymentów dotyczących transferu Fe-S z molekularnego rusztowania na białko docelowe, doktorantka często rozróżnia szybkość reakcji i wydajność reakcji. Czy mogłabym poprosić o wyjaśnienie, na czym polegają zmiany w wydajności reakcji, nie związane z szybkością?
5. Jak należy rozumieć zależne od czasu trwania reakcji wyraźne skoki w przebiegu widma dichroizmu kołowego holo-Fdx (rys. 37 i 38)?
6. Czy powstawanie centrów Fe-S bez udziału białka tworzącego molekularne rusztowanie jest tylko „eksperymentalnym artefaktem” czy też zjawisko to może mieć znaczenie biologiczne?

Wymienione powyżej uwagi i pytania nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Kleczewskiej. Uzyskane wyniki dotyczą ważnych aspektów funkcjonowania maszynerii ISC i biogenezy centrów Fe-S, w tym ich tworzenia i transferu do białek docelowych oraz udziału białek opiekuńczych i pomocniczych. Uzyskane wyniki są punktem wyjścia dla istotnych ustaleń dotyczących biogenezy centrów Fe-S oraz skutecznych rozwiązań praktycznych.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kleczewskiej jest świadectwem jej wiedzy, uzasadniającym ubieganie się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych



i przyrodniczych, dyscyplinie biotechnologia Dostarczona dokumentacja potwierdza, że mgr Małgorzata Kleczewska ma umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Co więcej, rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kleczewskiej stanowi nowatorskie i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim jest wyjaśnienie molekularnych podstaw biogenezy centrów Fe-S w białkach, pozostającej pod kontrolą maszynerii ISC. W związku z tym, niniejsza rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zatem, wnoszę o dopuszczenie mgr Małgorzaty Kleczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, jestem przekonana, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Kleczewskiej spełnia wymogi wyróżniania rozpraw doktorskich przez Radę Dyscypliny Biotechnologia UG, zawarte w stosownym regulaminie, i w związku z tym zasługuje na wyróżnienie. Doktoranta opracowała wydajne metody rekonstrukcji formowania centrów Fe-S w obrębie bakteryjnego i mitochondrialnego białka tworzącego molekularne rusztowanie oraz ich transferu do białek docelowych, co ma istotne znaczenie nie tylko w kontekście stworzenia modelu badawczego, ale także możliwych rozwiązań aplikacyjnych. Ponadto, wyniki bezpośrednio związane z badaniami realizowanymi w ramach tej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w trzech pracach eksperymentalnych, które ukazały się w czasopiśmie z listy JCR, i w jednej z tych prac doktorantka jest pierwszym autorem.



Hanna Kmita