



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

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Grabińskiej-Rogali:

„Oddziaływania systemu Hsp70 z substratem białkowym oraz rola tych oddziaływań w zależności od proteazy Lon degradacji substratu”

Centra żelazo-siarkowe (FeS) są jedną z najbardziej rozpowszechnionych grup kofaktorów metalicznych w przyrodzie. Specyficzne właściwości fizyko-chemiczne tych centr umożliwiają zachodzenie reakcji stanowiących o aktywności enzymatycznej wielu białek. Są zatem istotnym elementem samych centr aktywnych enzymów gdzie anagazują się w odpowiednie reakcje chemiczne, bądź stanowią elementy łańcuchów kofaktorowych biorących udział w procesach takich jak transfer elektronu w układach bioenergetycznych. W badaniach nad poznaniem działania centr FeS wyróżnić można dwa podstawowe obszary wiedzy. Obszar pierwszy obejmuje poznanie samych właściwości fizykochemiczne tych centr, ich interakcji otoczeniem białkowym i z innymi centrami w układach wielokofaktorowych. 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 wpisują się badania od lat prowadzone przez renomowany w tej dziedzinie zespół kierowany przez prof. dr hab. Jarosława Marszałka a wraz z nimi – przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Anety Grabińskiej-Rogali. W pracy tej doktorantka podejmuje nowatorskie badania mające na celu poznanie molekularnego mechanizmu wiązania i uwalniania substratu przez system angażujący białko szoku cieplnego (Hsp70) w procesie biogenezy białek zawierających centra FeS. Na wstępie należy podkreślić, że jest to ważne i aktualne zagadnienie w kontekście kompleksowego zrozumienia wszystkich aspektów biogenezy białek FeS, i ma fundamentalne znaczenie poznawcze dla wielu obszarów z dziedziny biochemii, biofizyki i biologii komórki. W tym kontekście wyniki przedstawione w tej pracy i ich analiza w znaczący sposób poszerzyły naszą wiedzę, co w największym skrócie podsumować można w trzech najważniejszych osiągnięciach pracy:

- dokonaniu biochemicznej rekonstrukcji potrójnego kompleksu składającego się z białka opiekuńczego Hsp70(Ssq1), białka pomocniczego JDP(Hsc20) i substratu białkowego Isu1 i wykazaniu, że tworzenie się tego kompleksu przebiega dwu-etapowo (tzn. do efektywnego oddziaływania z Ssq potrzebne jest wcześniejsze utworzenie kompleksu Hsc20-Isu1)
- opisanie strukturalnych elementów i dynamiki molekularnych oddziaływań zachodzących w obrębie w.w. kompleksu
- scharakteryzowaniu wpływu białek JDP/Hsp70 na degradację białka rusztowania IscU przez proteazę Lon.

Rozprawa zredagowana została języku polskim w typowym układzie obejmującym streszczenie (w tym dodatkowo streszczenie w j. angielskim), wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję

oraz bibliografię. W rozdziale „Wstęp” doktorantka w zwięzły i przejrzysty sposób wprowadza wybrane zagadnienia z obszaru biogenezy białek FeS i wiedzy jaką dysponujemy o układach biologicznych które zaangażowane są w ten proces, by doprowadzić do sformułowania głównych celów pracy przedstawionych w formie siedmiu pytań. Sekcja „Wyniki” jest dobrze osadzona w eksperymentach wykonanych wcześniej i stopniowo przeprowadza czytelnika przez coraz bardziej skomplikowane badania wykonane przez doktorantkę. Uwagę zwraca bardzo duża staranność wykonania rycin: każdemu żelowi SDS-PAGE towarzyszy analiza densytometryczna, a schematy oddziaływań badanych na biosensorze są wyraźnie zaznaczone kolorami zgodnie z wykresami kinetyki co bardzo ułatwia zrozumienie wyników. W tym miejscu należy docenić staranność i koncepcyjne przemyślenie opisywanych eksperymentów: samo tworzenie potrójnego kompleksu Ssq1*-Hsc20-Isu1 zostało stwierdzone za pomocą techniki precypitacji kompleksów, powtarzając eksperyment stosując białka fuzyjne z GST na każdej podjednostce. Doktorantka stosowała też liczne wymagane w tego typu eksperymentach kontrole, a także używała wariantów białek z wprowadzonymi pojedynczymi lub wielokrotnymi mutacjami. Wyraźnie zaznaczone jest co było wykonywane osobiście przez doktorantkę, a co we współpracy. Kolejny rozdział „Dyskusja” obejmuje cztery i pół strony maszynopisu. Choć może wydawać się to niezbyt dużo, doktorantka w syntetyczny i przejrzysty sposób tłumaczy w nim uzyskane wyniki i prezentuje swoje opinie odnosząc się do literatury, omawiając białka mitochondrialne, ewolucję organizmów oraz stawiając bazujące na tych wynikach hipotezy, które można weryfikować w dalszych badaniach. Syntetyczna dyskusja jest pochodną faktu, iż cały szereg wniosków i mechanistycznych konsekwencji został już przedstawiony przy omawianiu wyników w poprzednim rozdziale.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi następujące uwagi i spostrzeżenia:

1. Ze względu na stosunkowo dużą ilość stosowanych skrótów, zdecydowanym ułatwieniem byłoby umieszczenie listy skrótów.
2. We wstępie brakowało mi szerszego omówienia samych białek zawierających centra FeS i ich roli w układach biologicznych, z podaniem przykładów. Akapit na str 15 odnoszący się do tego zagadnienia wydaje się zbyt skrótowy.
3. W metodzie 4.7: Pomiar hydrolizy ATP Hsp7. Brakuje cytowania skąd pochodzi wartość molowego współczynnika ekstynkcji dla NADH, a wartość podana przez doktorantkę (6440) różni się od znanej mi wartości (6220 M⁻¹*cm⁻¹).
4. W Celach pracy: szkoda, że nie wszystkie punkty celów zostały zaopatrzone wyjaśnieniami (tekst w italiku), a także 3 punkt nie będący pytaniem wydaje się nie do końca pasować do formuły pytań zastosowanej w pozostałych punktach.
5. Pomiar interferometrii biowarstwy nie jest powszechnie stosowaną metodą, dlatego pomocny byłby bardziej szczegółowy opis samej metody w punkcie 4.10, wyjaśniający czytelnikowi fizyczne podstawy rejestrowanych sensogramów.
6. W nawiązaniu do samych wyników pomiarów przeprowadzonych w.w metodą: zastanawiam się czy z przebiegów kinetycznych rejestrujących formowanie potrójnego kompleksu nie można by było pokusić się o liczbowe oszacowanie czasów formowania poszczególnych kompleksów zamiast używać określeń "szybki wzrost sygnału", "szybkie wiązanie początkowe, po którym następowało wolniejsze wiązanie".
7. Mając na względzie postulowane oddziaływania elektrostatyczne między dodatnio naładowanymi resztami lizynowymi białka Hsc20 a ujemnie naładowaną resztą kwasu

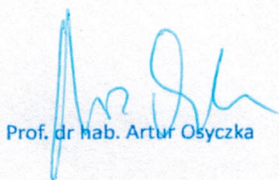
asparaginowego białka Ssq1 – zastanawiam się czy analizowany był może wpływ siły jonowej na to oddziaływanie. Jeśli nie, to jak w ocenie Doktorantki, siła jonowa mogłaby wpływać na kinetykę formowania kompleksów.

Z obowiązku recenzenta zwrócić muszę uwagę na nieliczne i na prawdę drobne niedociągnięcia językowe, zwłaszcza kalki z języka angielskiego, np.:

- "frakcje zawierające czyste białko IscUGST zagęściłam poprzez wirowanie (3500 g; 15 min.; 4°C; Sigma; rotor 11192) w *Centricon* o wielkości porów 10 kDa (Amicon® Ultra, Millipore)" - polski odpowiednik Centrikona to *koncentrator wirówkowy*
- dodanie do hodowli IPTG do *finalnego* stężenia równego - *końcowego*
- Po naniesieniu *supernatantu* z oczyszczanym białkiem – *nadsączu*

Powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny pracy doktorskiej Pani Grabińskiej-Rogali. Jest to wyjątkowo dobrze przemyślane i ciekawie napisane opracowanie naukowe. W moim przekonaniu praca świadczy o dużej dojrzałości doktorantki przy planowaniu, wykonywaniu, interpretowaniu i dyskusowaniu wyników badań naukowych. Wyniki te jako i ich interpretacja w znaczący sposób poszerzają naszą wiedzę na temat biogenezy białek FeS i mają zasięg międzynarodowy, o czym świadczyć może fakt, że część wyników omawianych w pracy została już opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *J. Mol. Biol.* gdzie doktorantka jest jednym z trzech równorzędnych pierwszych autorów (pozycja 106 w spisie literatury, w trakcie recenzji opublikowana w czasopiśmie).

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam, że **prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi niezbędne do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia**. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Marii Anety Grabińskiej-Rogali do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Walory samej rozprawy, w szczególności wyjątkowa naukowa waga osiągniętych w jej ramach wyników i proponowanego modelu oddziaływań pomiędzy białkami zaangażowanymi w proces biogenezy białek FeS sprawiają, że **rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą i dlatego wnoszę o jej uhonorowanie stosowną nagrodą**.



Prof. dr hab. Artur Osyczka