

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko

Rafał Dutkiewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

07.06.2001 - tytuł magistra biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański-Gdański Uniwersytet Medyczny, tytuł pracy magisterskiej „Rola genu *yhbZ* bakterii *Escherichia coli*” wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej UG pod kierunkiem dr Agaty Czyż oraz Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna

06.07.2005 - stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemia, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański-Gdański Uniwersytet Medyczny, tytuł pracy doktorskiej „Wyspecjalizowany system mitochondrialnych białek opiekuńczych uczestniczący w syntezie centrów żelazowo-siarkowych (Fe/S)” wykonana w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed pod kierunkiem Prof. dr hab. Jarosława Marszałka

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

01.10.2005-30.09.2008 – asystent, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański-Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej

10.01.2006-31.12.2007 – staż podoktorski w laboratorium Prof. Rolanda Lilla, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg, Marburg, Niemcy

01.10.2008-obecnie – adiunkt, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytet Gdański-Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra Biologii Molekularnej i Komórkowej

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Monotematyczny cykl publikacji pt.: „**Analiza strukturalno-funkcjonalna mitochondrialnych kompleksów białkowych zaangażowanych w biosyntezę centrów żelazo-siarkowych (Fe/S)**”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Dutkiewicz, R.**, Marszalek, J., Schilke, B., Craig, E.A., Lill, R., Muhlenhoff, U. (2006) „The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p” *J.Biol.Chem.* 281: 7801–7808

IF₂₀₀₆= 5,808 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=39

2. Andrew, A.J., **Dutkiewicz, R.**, Knieszner, H., Craig, E.A., Marszalek, J. (2006) „Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S biogenesis Isu1p” *J.Biol.Chem.* 281: 14580–14587

IF₂₀₀₆= 5,808 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=35

3. Ciesielski, S.J., Schilke, B.A., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., Joachimiak, A., Marszalek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2012) „Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe-S Scaffold Isu Is Indispensable In Vivo and Conserved in Evolution” *J. Mol. Biol.* 417(1-2): 1-12

IF₂₀₁₂= 3,905 / pkt MNiSW₂₀₁₄=30 / Cyt. WoS=15

4. Uzarska, M.A., **Dutkiewicz R.**, Freibert S.A., Lill, R., Muhlenhoff, U. (2013) „The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation” *Mol. Biol. Cell* 24(12): 1830-41

IF₂₀₁₃= 4,548 / pkt MNiSW₂₀₁₄=30 / Cyt. WoS=15

5. Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., Song, J.Y., Marszalek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2013) „Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine-desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive” *J.Biol.Chem.* 288: 29134–29142

IF₂₀₁₃= 4,600 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=6

6. Manicki, M., Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Blenska, A., Kominek, J., Marszalek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2014) „Overlapping Binding Sites of the Frataxin Homologue Assembly Factor and the Heat Shock Protein 70 Transfer Factor on the Isu Iron-sulfur Cluster Scaffold Protein” *J.Biol.Chem.* 289: 30268-30278

IF₂₀₁₄= 4,600 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=0

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Celem naukowym wyżej wymienionych prac było poznanie funkcjonowania mitochondrialnego systemu białek zaangażowanych w biosyntezę centrów żelazo-siarkowych (Fe/S). Centra Fe/S to grupy prostetyczne występujące w białkach zlokalizowanych we wszystkich przedziałach komórki eukariotycznej. Wiele z tych białek pełni funkcje niezbędne dla przeżycia organizmu, uczestnicząc w oddychaniu i syntezie ATP, biosyntezie kofaktorów, metabolizmie RNA i DNA oraz regulacji ekspresji genów (Lill i wsp., 2006). Mitochondria pełnią kluczową rolę w procesie biogenezy centrów Fe-S zarówno na potrzeby własne, jak też innych przedziałów komórkowych (Lill i wsp., 1999). Od bakteryjnych przodków mitochondria odziedziczyły złożoną maszynę białkową znaną jako system ISC (Iron-Sulfur-Cluster assembly). Biogeneza centrów Fe/S rozpoczyna się od ich syntezy w obrębie białka rusztowania (Isu, u *S. cerevisiae*). W procesie tym kompleks enzymatyczny desulferazy cysteinowej (Nfs1-Isd11) katalizuje odłączenie siarki od cysteiny i przekazanie jej na białko Isu. Źródło żelaza do syntezy Fe-S jest niezbyt dobrze poznane. Uważa się, że białko frataksyna (Yfh1, u *S. cerevisiae*) może pełnić rolę donora żelaza. W kolejnym etapie polegającym na przekazaniu centrum Fe/S z Isu na białko docelowe uczestniczy system białek opiekuńczych Hsp70 (wyspecjalizowane Ssq1 lub wielofunkcyjne Ssc1 oraz białko pomocnicze typu J - Jac1, u *S. cerevisiae*) (Craig i Marszalek, 2002; Vickery i Cupp-Vickery, 2007; Lill i wsp., 2008).

Wcześniej zidentyfikowano szereg czynników białkowych uczestniczących w procesie biogenezy Fe/S, brakowało jednak informacji na temat molekularnej organizacji tego procesu. Poprzez analogię do innych procesów zachodzących w mitochondriach (np. import białek, utrzymywanie i replikacja mtDNA) można było przypuszczać, że biogeneza Fe/S zachodzi w obrębie kompleksu złożonego z wielu białek. Można również było postawić hipotezę, że białko rusztowanie Isu stanowi centrum wokół, którego taki kompleks jest zorganizowany. Do tej pory brakowało również wyników systematycznych badań dotyczących indywidualnych oddziaływań białka rusztowania Isu z jego partnerami białkowymi, nie wiadomo było jaka jest kolejność tych oddziaływań oraz czy i w jakim stopniu oddziaływania te wzajemnie się wykluczają. To znaczy czy partnerzy białkowi oddziałują z Isu jednocześnie, czy też w określonej kolejności. W cyklu publikacji pt. „Analiza strukturalno-funkcjonalna mitochondrialnych kompleksów białkowych zaangażowanych w biosyntezę centrów żelazo-siarkowych (Fe/S)” odpowiedziałem na wiele postawionych powyżej pytań.

Rola mitochondrialnego systemu białek opiekuńczych Ssq1-Jac1 w procesie biosyntezy centrów żelazo-siarkowych (Fe/S)

W pierwszej publikacji (Dutkiewicz, R., Marszalek, J., Schilke, B., Craig, E.A., Lill, R., Muhlenhoff, U. (2006) „The Hsp70 chaperone Ssq1p is dispensable for iron-sulfur cluster formation on the scaffold protein Isu1p” *J.Biol.Chem.* 281: 7801–7808) podjąłem próbę wyjaśnienia biochemicznych podstaw działania białek opiekuńczych w procesie biogenezy białek zawierających centra Fe/S jako grupy prostetyczne, co wymagało opracowania technik badawczych *in vitro* z użyciem oczyszczonych białek w warunkach beztlenowych. Aby zbadać wpływ systemu białek opiekuńczych Ssq1-Jac1 na stabilność wiązania centrum Fe/S w obrębie białka Isu1, na wstępie konieczna była izolacja kompleksu Isu1 ze związanym centrum Fe/S. Formowanie centrum Fe/S w obrębie białka Isu w warunkach *in vitro* wymaga warunków ściśle beztlenowych, co pokazano poprzednio dla bakteryjnego systemu ISC (iron sulfur cluster). W związku z tym, że w Gdańsku nie dysponowałem komorą do badań beztlenowych, badania przeprowadziłem w laboratorium

Prof. Rolanda Lilla w Marburgu w Niemczech (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg). Standardowa reakcja rekonstytucji centrum Fe/S w obrębie Isu1 obejmowała formę apo-Isu1 (czyli białko bez związanego centrum Fe/S), L-cysteinę (źródło siarki w reakcji katalizowanej przez desulferazę cysteinową Nfs1), katalityczne ilości oczyszczonej desulferazy cysteinowej, cytrynian żelazowy amonu (źródło żelaza). Obecność centrum Fe/S związanego z białkiem potwierdziłem poprzez analizę widma absorpcji w zakresie UV-Vis.

Podczas miareczkowania białka Isu1 obserwowałem liniowy wzrost absorpcji wraz z rosnącym stężeniem białka Isu1, co świadczy o tym, że stężenie białka Isu1 w mieszaninie reakcyjnej jest elementem limitującym szybkość reakcji. Następnie zbadałem rolę desulferazy cysteinowej, białka Nfs1, w procesie rekonstytucji centrum Fe/S poprzez pomiar szybkości formowania centrum Fe/S w obrębie Isu1 w obecności wzrastających stężeń białka Nfs1. Przy wysokich stężeniach Nfs1, obserwowałem wysycenie szybkości formowania centrum Fe/S, co świadczy o katalitycznej roli desulferazy cysteinowej Nfs1. Tak więc na podstawie otrzymanych wyników stwierdziłem, że centrum Fe/S może być syntetyzowane w obrębie Isu1 z udziałem Nfs1 oraz że synteza centrum Fe/S może zachodzić bez obecności systemu białek opiekuńczych.

Następnie zbadałem wpływ białek opiekuńczych na szybkość formowania centrum Fe/S w obrębie białka Isu1. Obecność Ssq1, Jac1 i Mge1 w mieszaninie reakcyjnej zwiększyła szybkość syntezy. Wzrost szybkości był specyficzny, ponieważ nie obserwowałem wzrostu absorpcji przy braku białka akceptorowego – Isu1. W związku z tym pojawiło się kolejne pytanie, jaki mechanizm leży u podstaw tej stymulacji. Efektywniejsze formowanie centrum Fe/S w obrębie Isu1 w obecności białek Ssq1-Jac1-Mge1 mogło być związane z wpływem białek opiekuńczych na wzrost aktywności białka Nfs1. Okazało się, że rzeczywiście w obecności białek opiekuńczych Ssq1, Jac1 i Mge1 obserwowałem stymulację aktywności białka Nfs1.

Kolejne pytanie jakie postawiłem dotyczyło specyficzności stymulacji aktywności białka Nfs1 przez system białek Ssq1-Jac1-Mge1, czyli czy obserwowana stymulacja zależy od obecności białek biorących udział w cyklu ATPazowym białka Ssq1. Czy też jest to niespecyficzny efekt i wiąże się z zdolnościami białek opiekuńczych do oddziaływania z nieprawidłowo sfałdowanymi białkami oraz ich ochroną przed agregacją i inaktywacją. Aby odpowiedzieć na to pytanie zmierzyłem aktywność białka Nfs1 w obecności mitochondrialnego systemu niewyspecjalizowanych białek Ssc1-Mdj1-Mge1, który uczestniczy między innymi w fałdowaniu białek, czy w ochronie białek przed działaniem czynników stresowych. Okazało się, że aktywność desulferazy cysteinowej była jeszcze efektywniej stymulowana, niż w przypadku obecności białek Ssq1-Jac1-Mge1. Jednocześnie uzyskane wyniki *in vitro* nie miały przełożenia na warunki fizjologiczne, ponieważ delecja genu $\Delta ssq1$ nie powodowała obniżenia aktywności desulferazy cysteinowej Nfs1. Podsumowując otrzymane wyniki sugerowały, że stymulacja aktywności desulferazy cysteinowej Nfs1 przez białko Ssq1 jest niespecyficzna i można ją traktować jako artefakt doświadczalny w warunkach *in vitro*. W związku z tym, że stymulacja aktywności białka Nfs1 przez system białek Ssq1-Jac1-Mge1 jest niespecyficzna, pojawiło się pytanie, czy wyspecjalizowane w procesie biogenezy centrów Fe/S - białko Ssq1 wykazuje jednocześnie funkcje białka opiekuńczego w ochronie białek przed agregacją. Aby odpowiedzieć na to pytanie, przeprowadziłem doświadczenie w którym badałem zdolność białka Ssq1 do ochrony przed agregacją zdenaturowanej rodanazy (Silberg i wsp., 1998). Okazało się, że obecność białka Ssq1 hamowała agregację rodanazy. Powyższe wyniki pokazują, że szybkość formowania centrów Fe/S w obrębie białka Isu1 wielokrotnie wzrasta w obecności białek opiekuńczych Ssq1-Jac1-Mge1. Jednak szybsze formowanie centrum Fe/S w obecności białek opiekuńczych jest związane ze wzrostem aktywności desulferazy cysteinowej, która dostarcza

więcej siarki. Stymulacja aktywności desulferazy cysteinowej wiąże się z obecnością białka Ssq1, które wykazuje oprócz funkcji wyspecjalizowanych w biogenezie centrów Fe/S, także funkcje ochronne białka opiekuńczego.

Kolejny etap badań miał na celu zweryfikowanie, czy białka opiekuńcze mogą być zaangażowane w transfer centrum Fe/S z molekularnego rusztowania – Isu1 do odpowiednich białek akceptorowych. Aby odpowiedzieć na to pytanie, zastosowaliśmy system doświadczalny, w którym dokonaliśmy pomiaru formowania centrów Fe/S *in vivo*, przeprowadzając znakowanie hodowli drożdżowej radioaktywnym żelazem ⁵⁵Fe. Na wstępie skonstruowaliśmy szczep drożdżowy w których interesujący nas gen *ISU1* umieszczono pod kontrolą promotora GAL (galaktozowego), czyli ekspresja genu następowała w obecności galaktozy, a represja w obecności glukozy. Wykorzystując przygotowany szczep, przeprowadziliśmy analizę *in vivo*, której celem była odpowiedź na pytanie, czy mutacje w obrębie motywu P134V135K136 białka Isu1 które obniżają powinowactwo do Ssq1 mają wpływ na formowanie centrum Fe/S w obrębie białka Isu1. Otrzymane wyniki pokazały, że w obrębie zmutowanych wersji Isu możemy obserwować efektywną syntezę centrów Fe/S. Natomiast silny defekt syntezy centrów ma miejsce w obrębie mitochondrialnego białka akceptorowego – akonitazy. Tak więc przeprowadzona analiza przekonała nas, że system białek opiekuńczych wymagany jest na późniejszym etapie biogenezy centrów Fe/S podczas transferu już uformowanego centrum Fe/S z białka Isu1 do odpowiedniego białka akceptorowego.

Biochemiczna charakterystyka oddziaływania białka rusztowania Isu z białkiem J, Jac1

W drugiej publikacji (Andrew, A.J., **Dutkiewicz, R.**, Knieszner, H., Craig, E.A., Marszałek, J. (2006) „Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S biogenesis Isu1p” *J.Biol.Chem.* 281: 14580–14587) na wstępie pokazałem, że domena C-końcowa Jac1 jest wystarczająca do wiązania substratu Isu1. W tym celu oczyściłem C-końcową domenę białka Jac1. Chcąc odpowiedzieć na pytanie, czy domena ta odpowiada za wiązanie substratu, zastosowałem technikę wirowania w gradiencie glicerolu. Różnica prędkości opadania cząsteczek o różnej wielkości zależy w przybliżeniu od różnicy ich mas cząsteczkowych. Dlatego im cięższe białko, tym szybciej migruje. Jeśli białka tworzą stabilny kompleks zachowują się jak jedna cząsteczka o odpowiednio większej masie, więc w momencie zakończenia wirowania wspólnie lokalizują się bliżej dna gradientu niż te same białka wirowane osobno. Kiedy oba białka, Isu1 oraz C-końcowa domena białka Jac1, były obecne w mieszaninie reakcyjnej, obserwowałem przemieszczenie ich pozycji w dół gradientu w stosunku do białek wirowanych osobno. Wynik ten jednoznacznie świadczył o formowaniu kompleksu.

Podczas dalszych badań na podstawie porównania sekwencji C-końcowych domen białek Jac1 i HscB z *E. coli*, którego struktura krystaliczna została rozwiązana (Cupp-Vickery i Vickery, 2000) zidentyfikowaliśmy silnie konserwowany region w obrębie C-końcowej domeny Jac1 składający się z sześciu aminokwasów: L104, K107, D110, D113, E114, Q117, który mógł stanowić potencjalne miejsce oddziaływania z molekularnym rusztowaniem Isu1. Niemniej przeprowadzona analiza *in vivo* komórek drożdżowych posiadających mutacje w wytypowanym motywie nie pokazała, że posiadają zaburzony fenotyp, co wskazywało, że oddziaływanie z substratem nie jest zaburzone, albo nie jest wymagane w warunkach fizjologicznych. Z drugiej strony przeprowadzając doświadczenie *in vitro* polegające na precypitacji kompleksów białkowych, pokazaliśmy że zaproponowane aminokwasy w obrębie Jac1 są zaangażowane w formowanie kompleksu z białkiem Isu1.

Kolejnym nasuwającym się pytaniem, było jak osłabienie wiązania Jac1 do Isu1 wpływa na oddziaływanie tych białek z Ssq1. Aby na nie odpowiedzieć, zbadałem wpływ

wzrastającego stężenia białek Jac1wt lub z mutacjami alaninowymi w obrębie regionu LKDDEQ na stymulację aktywności ATPazowej Ssq1. Obserwowałem bardzo nieznaczne różnice pomiędzy stymulacją ATPazy przez dzikie i zmutowane białko Jac1. Wynik ten sugerował, że osłabienie oddziaływania białka Jac1 z substratem może być kompensowane przez inne silne oddziaływania pomiędzy białkami, podobnie jak ma to miejsce w przypadku mutacji V472F w obrębie Ssq1, która obniża powinowactwo tego białka do substratu Isu1 (Knieszner i wsp., 2005). Na podstawie tych obserwacji postawiliśmy hipotezę, że u *S. cerevisiae* poszczególne komponenty systemu Hsp70 zaangażowanego w syntezę centrów Fe/S, czyli białka Ssq1 i Jac1, oddziałują na tyle silnie z białkiem substratowym Isu1, że w momencie, gdy tylko jedna z tych interakcji zostanie zaburzona, drugi nie zmieniony komponent systemu może poprzez inne silne interakcje kompensować takie zaburzenie, przez co system jest nadal funkcjonalny. W związku z tym jeśli hipoteza ta jest prawdziwa, równoczesne osłabienie dwóch niezależnych interakcji np.: oddziaływania Isu1 z Jac1 oraz Isu1 z Ssq1, powinno spowodować poważne zaburzenie funkcjonowania systemu. W tym celu skonstruowaliśmy szczep *S. cerevisiae*, w którym obecne były jedynie zmutowane kopie białek – Ssq1V472F oraz Jac1LKDDEQ. Szczep taki rósł wolniej w temperaturze permissywnej, a w warunkach szoku termicznego jego wzrost ulegał całkowitemu zahamowaniu. Pokazuje to, że oddziaływania między białkiem Isu1, a białkami Ssq1 i Jac1 są istotne dla ich funkcji *in vivo* w biogenezie centrów Fe/S, lecz na tyle silne i specyficzne, że dopiero osłabienie obu tych oddziaływań powoduje wyraźny efekt fenotypowy. W pracy tej pokazaliśmy również, że funkcja białka Jac1 polega na kierowaniu białka Isu1 do kompleksu z Ssq1. W doświadczeniach wykorzystaliśmy peptyd Isu1 zawierający motyw PVK kluczowy do prawidłowego oddziaływania z białkiem Ssq1 (Dutkiewicz i wsp., 2004). Eksperyment plazmonowego rezonansu powierzchniowego wykazał, że peptyd nie oddziałuje z Jac1. Niemniej jest on zdolny do stymulacji aktywności białka Ssq1. Z drugiej strony wprowadzenie do mieszaniny reakcyjnej mutanta Ssq1V472F charakteryzującego się osłabionym wiązaniem substratu lub Jac1HPD/AAA z mutacjami w obrębie J domeny, która odpowiada za aktywację Hsp70 powodowało, że ATPaza Ssq1 nie była stymulowana. Uzyskane wyniki sugerują, że białko Jac1 w kompleksie z białkiem Isu1 wspomaga wiązanie substratu przez C-końcową domenę białka Ssq1 i poprzez stymulację ATPazy Ssq1 promuje przyjęcie konformacji zamkniętej, powodując stabilne wiązanie substratu. Gdy osłabione zostanie oddziaływanie pomiędzy białkami Jac1 i Isu1, większego znaczenia nabiera niezależnie oddziaływanie tych białek z Ssq1. Ponadto w doświadczeniach *in vivo* pokazaliśmy, że formowanie stabilnego kompleksu Jac1-Isu1 jest kluczowe podczas oddziaływania z białkiem wielofunkcyjnym Ssc1 w procesie biogenezy centrów Fe/S. Ten wynik jednoznacznie pokazał, że w odróżnieniu od białka wyspecjalizowanego w procesie biosyntezy centrów Fe/S - Ssq1, które do pewnego stopnia toleruje zmiany osłabiające oddziaływania pomiędzy poszczególnymi komponentami maszyny, białko wielofunkcyjne - Ssc1 takiej tolerancji już nie wykazuje.

W trzeciej publikacji Ciesielski, S.J., Schilke, B.A., Osipiuk, J., Bigelow, L., Mulligan, R., Majewska, J., Joachimiak, A., Marszalek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2012) „Interaction of J-Protein Co-Chaperone Jac1 with Fe-S Scaffold Isu1 Is Indispensable In Vivo and Conserved in Evolution” *J. Mol. Biol.* 417(1-2): 1-12 kontynuowałem charakterystykę biochemiczną oddziaływania pomiędzy białkami mitochondrialnej maszyny zaangażowanej w biosyntezę centrów Fe/S. W tym celu oczyściłem do homogenności białko Jac1wt z *S.cerevisiae* w celu otrzymania jego kryształu oraz próby rozwiązania struktury białka. Oczyszczone białko zostało skrytalizowane we współpracy z zespołem Prof. Andrzeja Joachimiaka z Argonne National Laboratory (Jerzy Osipiuk, Lance Bigelow, Rory Mulligan i Andrzej Joachimiak, USA). Otrzymane kryształy białka ScJac1p charakteryzują się następującymi parametrami: resolution limits 54,44-1,9Å;

2mol./assymetric unit; R-factor 0,200; R_{free} 0,257. Struktury białka (3UO2 oraz 3UO3) zostały zdeponowane w bazie Protein Data Bank.

Analiza struktury Jac1S.c. wykazała, że istnieje dodatkowy silnie konserwowany rejon, składający się z czterech aminokwasów: L105L106L109Y163. Na wstępie zbadaliśmy funkcję białka z wprowadzonymi zmianami na reszty alaniny (tzw. alanine screen) w rejonie LLLYDDEQ *in vitro* i *in vivo*. Mutant obejmował zarówno nowy region, jak i powyżej opisany region zawierający naładowane aminokwasy. Aby oszacować spadek efektywności wiązania białka Isu1 przez mutanty białka Jac1, przeprowadziliśmy doświadczenie typu precypitacja kompleksów białkowych, które wykazało że zamiana całego rejonu LLLYDDEQ białka Jac1 na alaninę spowodowała brak oddziaływania z substratem Isu1-GST. Dotychczas pokazaliśmy, że specyficzne oddziaływanie pomiędzy Ssq1, a białkiem rusztowaniem Isu jest niezbędne dla transferu Fe/S na białko docelowe zarówno *in vivo*, jak też *in vitro*. Oddziaływaniami temu sprzyja obecność białka współpracującego Jac1, które wiąże Isu niezależnie od Ssq1 i następnie ułatwia powstanie oraz stabilizuje kompleks Ssq1-Isu. W warunkach *in vitro* o funkcjonalnym oddziaływaniami kompleksu białek Jac1-Isu1 z Ssq1 świadczy stymulacja aktywności ATPazy Ssq1. W związku z tym, aby oszacować spadek efektywności wiązania białka Isu1 przez mutanty białka Jac1 zmierzaliśmy stymulację ATPazy Ssq1. Okazało się, że zmutowanie całego rejonu LLLYDDEQ spowodowało dramatyczny spadek stymulacji aktywności Ssq1.

Po raz pierwszy pokazaliśmy z wykorzystaniem komórek drożdżowych, że zaburzenie oddziaływania białek Ssq1-Jac1-Isu1 oraz defekt stymulacji ATPazy Ssq1 ma znaczenie fizjologiczne i przekłada się na efekt *in vivo*. Mutacja polegająca na wprowadzeniu reszt alaniny w obrębie całego regionu LLLYDDEQ okazała się letalna. W następnej kolejności przeprowadziliśmy analizę, której celem było wyselekcjonowanie mutanta z minimalną ilością wprowadzonych zmian w rejonie LLLYDDEQ, a który charakteryzuje się znacząco zaburzonym oddziaływaniem z Isu1. Ta analiza pokazała, że zamiana trzech aminokwasów (L105L109Y163) jest wystarczająca do dramatycznego efektu *in vitro* porównywalnego z efektem obserwowanych w przypadku mutanta ze zmienionym całym rejonem oraz do silnego zahamowania wzrostu komórek drożdżowych. W związku z tym uzyskane przez nas wyniki pokazały, że hydrofobowy charakter reszt L105, L109 oraz Y163 ma największe znaczenie dla stabilności kompleksu Jac1-Isu1 oraz że w mniejszym stopniu uczestniczą w nim reszty naładowane ujemnie

System białek opiekuńczych (Ssq1-Jac1) wymagany jest do transferu uformowanego centrum Fe/S z białka Isu1 do odpowiedniego białka akceptorowego. W związku z tym, aby zbadać jaki jest efekt zaburzenia oddziaływania pomiędzy białkiem Jac1 oraz Isu1 na biosyntezę centrów Fe/S w obrębie białek akceptorowych, zmierzaliśmy aktywność akonitazy oraz dehydrogenazy bursztynianowej (obecność centrum Fe/S jest niezbędna do aktywności enzymatycznej tych białek) w wyizolowanych mitochondriach ze szczepu dzikiego oraz szczepu ze zmutowaną wersją białka Jac1 w rejonie LLY. Okazało się, że w przypadku mutanta ma miejsce dramatyczny spadek aktywności enzymów, co sugeruje że komórki zawierające zmutowaną formę Jac1 nie produkują funkcjonalnych centrów Fe/S.

W piątej pracy Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Kominek, J., Blenska, A., Delewski, W., Song, J.Y., Marszałek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2013) „Binding of the chaperone Jac1 protein and cysteine-desulfurase Nfs1 to the iron-sulfur cluster scaffold Isu protein is mutually exclusive” *J.Biol.Chem.* 288: 29134–29142 znając rejon w obrębie białka Jac1 zaangażowany w oddziaływanie z Isu1 przeprowadziliśmy analizę *in silico*, uzyskanego modelu kompleksu białek Jac1-Isu1 w celu wyznaczenia powierzchni białka Isu1 potencjalnie zaangażowanej w oddziaływanie. Aby zweryfikować hipotezę o oddziaływaniu powierzchnia-powierzchnia skonstruowaliśmy mutanta Isu1, w którym zamieniliśmy na reszty alaniny te reszty aminokwasowe (L63V72F94), które zgodnie z obliczeniami mogą oddziaływać z Jac1.

Okazało się, że wprowadzone zmiany są letalne. Obserwowany efekt *in vivo* jest znacznie silniejszy w przypadku mutacji w obrębie Isu1, niż w przypadku mutacji w komplementarnym regionie białka Jac1 L105AL109AY163A, która związana jest z obniżonym tempem wzrostu komórek drożdżowych. Ten wynik sugerował, że region L63V72F94 Isu1 jest prawdopodobnie miejscem rozpoznawanym przez inne białko lub białka maszyny odpowiedzialnej za biosyntezę centrów Fe/S. Ponieważ mutacje w obrębie regionu L63AV72AF94A białka Isu1 są letalne dla komórki drożdżowej, postanowiliśmy sprawdzić czy mutacja ta nie wpływa na poziom ekspresji białka Isu1. W tym celu wykorzystaliśmy szczep GAL-ISU1/ Δ isu2. Szczep ten posiada chromosomalny gen *ISU1* pod kontrolą promotora galaktozowego, w związku z tym ekspresja kopii chromosomalnej następuje podczas hodowli na pożywce z galaktozą, a represja podczas hodowli na pożywce z glukozą. Przeprowadzona analiza typu western blotting, nie wykazała różnic w poziomie mutantów *isu1* w rejonie LVF w stosunku do białka dzikiego.

Aby zbadać jaki jest efekt mutacji w obrębie regionu LVF białka Isu1 na biosyntezę centrów Fe/S w obrębie białek akceptorowych, zmierzyłem aktywność akonitazy oraz dehydrogenazy bursztynianowej w wyizolowanych wcześniej mitochondriach. Okazało się, że w przypadku mutantu obserwowałem dramatyczny spadek aktywności obu enzymów. Chcąc potwierdzić *in vitro* kluczową rolę regionu LVF w obrębie Isu1 w oddziaływaniu z Jac1, oczyściłem wersje białka Isu1 ze zmienionym rejonem hydrofobowym na alaniny (L63A; V72A oraz F94A) oraz ze znacznikiem GST wprowadzonym na C-końcu. Następnie przeprowadziliśmy analizę oddziaływania mutantu Isu1 z białkiem Jac1 w doświadczeniach precypitacji kompleksów białkowych, która wykazała że było ono o 40% zredukowane. W związku z tym przygotowaliśmy wariant białka Isu1 z substytucją trzech reszt aminokwasowych na reszty seryny, posiadające polarną grupę hydroksylową. Mutacje o charakterze polarnym całkowicie zaburzyły oddziaływanie białka Isu1 z Jac1. Uzyskane wyniki jednoznacznie pokazały, że reszty L63, V72, F94 białka Isu1 mają istotne znaczenie dla oddziaływania z białkiem Jac1. W następnej kolejności zbadaliśmy jak mutacje zaburzające oddziaływanie Jac1:Isu1 wpływają na formowanie kompleksu pomiędzy białkiem Hsp70 (Ssq1) i substratem (Isu1). W tym celu wykorzystaliśmy technikę detekcji kompleksu białek Ssq1-Isu1GST, powstającego w obecności białka Jac1 w warunkach *in vitro*. To doświadczenie pokazało, że zarówno mutacje w obrębie białka Jac1 (L105 L109 Y163), jak i Isu1 (L63S V72S F94S) uniemożliwiają efektywne formowanie kompleksu Ssq1-Isu1GST.

Analiza strukturalno-funkcjonalna kompleksów białkowych podczas mitochondrialnej biogenezy centrów Fe/S

Aby odpowiedzieć na pytanie dotyczące kolejności oddziaływań Isu1 z białkami biogenezy Fe/S, przeprowadziliśmy analizę bioinformatyczną opublikowanego kryształu kompleksu bakteryjnych białek IscS-IscU („Structural basis for Fe-S cluster assembly and tRNA thiolation mediated by IscS protein-protein interactions” Shi, R., Proteau, A., Villarroya, M., Moukadiri, I., Zhang, L., Trempe, J.F., Matte, A., Armengod, M.E., Cygler, M. *PLoS Biol.* (2010); 8(4):e1000354). Otrzymane wyniki tej analizy sugerowały, że zidentyfikowany przez nas rejon hydrofobowy białka Isu1 jest zaangażowany jednocześnie w oddziaływanie z białkiem Jac1 oraz białkiem Nfs1. Dodatkowo ta analiza wykazała potencjalne aminokwasy w obrębie białka Nfs1 (P478, L479, M482), które mogą być zaangażowane w oddziaływanie z Isu1.

Za pomocą techniki typu precypitacja kompleksów białkowych, wykorzystując białko Isu1-GST udało nam się zidentyfikować oraz określić stechiometrię oddziaływania Isu1:Nfs1. Następnie pokazaliśmy, że pojedyncze zmiany reszt aminokwasowych w obrębie białka Isu1

(L63A, V72A oraz F94A) powodują obniżenie powinowactwa do Nfs1, natomiast w przypadku wariantu białka Isu1 LVF/AAA kompleks z desulfurazą cysteinową nie jest tworzony.

Kolejnym etapem badań było przygotowanie mutantów białka Nfs1 w rejonie P478L479M482, który wytypowaliśmy jako potencjalnie zaangażowany w oddziaływanie z białkiem Isu1. Ponieważ mutacja proliny często prowadzi do zaburzenia struktury białka na dalszych etapach badań skoncentrowaliśmy się na roli leucyny i metioniny podczas formowania kompleksu z Isu1. Analiza *in vivo* wykazała, że mutacja L479 i M482 jest letalna dla komórki drożdżowej. W związku z tym postanowiliśmy zbadać efekty tych mutacji w obrębie białka Nfs1 na biosyntezę centrów Fe/S. W tym celu zmierzaliśmy aktywność akonitazy oraz dehydrogenazy bursztynianowej w wyizolowanych wcześniej mitochondriach ze szczepu GAL-*NFS1* transformowanego odpowiednim plazmidem. Analiza ta wykazała dramatyczny spadek aktywności zarówno akonitazy, jak i dehydrogenazy bursztynianowej w przypadku mutantu LM/AA. Następnie oczyściliśmy mutanty desulfurazy cysteinowej w regionie LM (L/A, M/A, LM/AA) w celu zbadania *in vitro* oddziaływania z białkiem Isu1-GST. Wyniki doświadczeń biochemicznych potwierdziły, że wytypowany region desulfurazy cysteinowej jest istotny przy tworzeniu kompleksu z białkiem Isu1, w przypadku pojedynczych mutantów L/A oraz M/A obserwowaliśmy istotny spadek ilości Nfs1 w kompleksie z Isu1, z kolei mutacja podwójna (LM/AA) powodowała spadek powinowactwa desulfurazy cysteinowej do białka Isu1 o ponad 75%.

W następnej kolejności sprawdziliśmy, czy wprowadzone mutacje nie zaburzają konformacji i aktywności desulfurazy cysteinowej. W tym celu zmierzaliśmy aktywność enzymatyczną wszystkich mutantów. Zbliżone wartości aktywności enzymatycznej do kontroli dzikiej sugerują, iż te mutacje nie powodują znaczących zmian w strukturze białka, a obniżone powinowactwo do Isu1 jest wynikiem braku kluczowych reszt aminokwasowych, niezbędnych do tworzenia kompleksu z molekularnym rusztowaniem.

Przeprowadzona analiza struktury krystalicznej kompleksu homologów bakteryjnych IscS:IscU (Shi i wsp., 2010) (Nfs1 : Isu1), a także nasze analizy biochemiczne oraz *in silico* kompleksu Jac1:Isu1 wskazują, że Nfs1 oraz Jac1 dzielą to samo miejsce oddziaływania na Isu1. W związku z tym, wykorzystując technikę precypitacji kompleksów białkowych sprawdziliśmy współzawodnictwo Jac1 i Nfs1 do wiązania się z Isu1. W przypadku, kiedy mieszanina reakcyjna zawierała białka Isu1:Nfs:Jac1 obserwowaliśmy znaczne obniżenie oddziaływania Isu1:Nfs1 w stosunku do kontroli niezawierającej białka Jac1. Rezultat ten wyraźnie sugeruje, że białka Nfs1 i Jac1 mają to samo miejsce wiązania w obrębie białka Isu1. Tą hipotezę potwierdziły doświadczenia z mutantami białek Jac1 oraz Nfs1, które są defektywne w oddziaływaniu z Isu1. Kiedy mieszanina reakcyjna zawierała mutantą Nfs1LM/AA nie wypierał on białka Jac1 z kompleksu z Isu1 i podobnie mutant Jac1 LLY/AAA nie wypierał desulfurazy cysteinowej z kompleksu z białkiem Isu1. Powyższe wyniki pozwalają na postawienie hipotezy, która zakłada że białko Jac1 najprawdopodobniej wypiera Nfs1 z kompleksu z Isu1, a w kolejnym etapie aktywuje białko Ssq1 do wiązania się z Isu1. To z kolei może świadczyć o regulacyjnej roli białka Jac1, które to kontroluje szybkość transferu centrów Fe/S z Isu1 do docelowego białka.

W czwartej pracy Uzarska, M.A., **Dutkiewicz R.**, Freibert S.A., Lill, R., Muhlenhoff, U. (2013) „The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation” *Mol. Biol. Cell* 24(12): 1830-41 w doświadczenia typu immunoprecypitacja pokazaliśmy, że białka Ssq1 oraz Grx5 tworzą kompleks. Aby zbadać, czy białko Ssq1 oddziałuje z Grx5 przygotowaliśmy plazmidy pozwalające na nadprodukcję białka Grx5 oraz Ssq1-GST w komórkach *S.cerevisiae*. Po wyizolowaniu mitochondrii i przygotowaniu lizatów mitochondrialnych przeprowadziliśmy immunoprecypitację, stosując przeciwciała anti-Grx5 lub oczyszczanie białka Ssq1-GST.

Oba doświadczenia potwierdziły, że białka Ssq1 oraz Grx5 tworzą kompleks. Kompleks ten jest specyficzny, ponieważ doświadczenia kontrolne wykluczyły również efektywne oddziaływanie pomiędzy glutaredoksyną Grx5 i białkiem Ssc1 (wielofunkcyjne mitochondrialne białko Hsp70). Ponadto przeprowadzone eksperymenty nie pozwoliły na wykrycie kompleksów pomiędzy Ssq1 i białkiem akceptorowym, np. z akonitazą. Kompleks Ssq1-Grx5 jest tworzony niezależnie od formowania centrum w obrębie Isu1 oraz formowania kompleksu Ssq1-Isu1-Fe/S, co zostało potwierdzone w doświadczeniach, w których wykorzystaliśmy mitochondria uzyskane ze szczepów GAL-*NFS1*, GAL-*JAC1* oraz GAL-*ISU1/Δisu2*. Hodowla komórek drożdżowych na pożywce z glukozą pozwoliła na uzyskanie mitochondrii, w których odpowiednio ilość białka Nfs1, Jac1 oraz Isu1 jest poniżej progu detekcji podczas analizy typu western blotting. Wiązanie białka Grx5 do Ssq1 nie jest związane ze stymulacją aktywności ATPazowej wyspecjalizowanego Hsp70, w związku z tym aby zweryfikować *in vitro*, czy Grx5 oddziałuje z Ssq1 przeprowadziliśmy serię termoforez na mikroskalę (ang. microscale thermophoresis, MST). Technika ta polega na rozdzieleniu białek w gradiencie temperatur. Zmiany konformacji i/lub formowanie kompleksów białkowych mają wpływ na rozdział termoforetyczny. W oparciu o ten efekt można wyznaczyć parametry kinetyczne reakcji, jeżeli kompleks pomiędzy białkami jest tworzony (Wienken i wsp., 2010; Zillner i wsp., 2012). To podejście pozwoliło nam pokazać, że białka Ssq1 i Grx5 formują kompleks. Kolejne doświadczenia pokazały, że tworzenie kompleksu nie jest hamowane w obecności peptydu AKELSLPPVKLHC będącego fragmentem naturalnego substratu Ssq1, białka Isu. Gdyby miejsce wiązania Grx5 pokrywało się z miejscem oddziaływania z substratem miałyby miejsce zahamowanie tego oddziaływania w obecności peptydu.

Po raz pierwszy w warunkach fizjologicznych pokazaliśmy, że białko Grx5 wiąże centrum Fe/S poprzez znakowanie hodowli drożdżowej izotopem ^{55}Fe i immunoprecypitację białka Grx5. Co więcej formowanie centrum $^{55}\text{Fe/S}$ w obrębie białka Grx5 wymaga obecności funkcjonalnej mitochondrialnej maszynerii zaangażowanej w biosyntezę centrów Fe/S (między innymi desulfurazy cysteinowej, białek Isu1, Jac1 oraz Ssq1). Ponadto pokazaliśmy, że białko Grx5 jest wymagane podczas formowania centrów Fe/S w obrębie wszystkich typów docelowych białek komórkowych. Obniżenie poziomu białka Grx5 skutkowało brakiem centrum Fe/S w obrębie bakteryjnych białek Bfd (typ centrum 2Fe/2S), ferrodoksyny HiPIP (typ centrum 4Fe/4S), czy w obrębie cytozolu białka drożdżowego Leu1 (typ centrum 4Fe/4S). Podsumowując w oparciu o otrzymane wyniki proponujemy, że równoczesne wiązanie białka Isu1-Fe/S oraz apo-Grx5 do Ssq1 umożliwia efektywny transfer centrum z Isu1 do Grx5. W następnej kolejności niezmiernie interesującym byłoby zbadanie oddziaływania białka Hsp70 z Grx5 u organizmów posiadających jedno wielofunkcyjne mitochondrialne białko Hsp70, jak wyglądała koewolucja obu białek uczestniczących w procesie biogenezy centrów Fe/S (Schilke i wsp., 2006; Puksza i wsp., 2010).

W końcu w szóstej pracy Manicki, M., Majewska, J., Ciesielski, S.J., Schilke, B., Blenska, A., Kominek, J., Marszałek, J., Craig, E.A., **Dutkiewicz, R.** (2014) „Overlapping Binding Sites of the Frataxin Homologue Assembly Factor and the Heat Shock Protein 70 Transfer Factor on the Isu Iron-sulfur Cluster Scaffold Protein” *J.Biol.Chem.* 289: 30268-30278 na podstawie analizy dostępnych danych strukturalnych oraz modelowania komputerowego wytypowaliśmy reszty aminokwasowe, które przypuszczalnie zaangażowane są w interakcje pomiędzy Yfh1, a Nfs1(Isd11) oraz Isu1, a Yfh1, które mają istotne znaczenie dla formowania kompleksu białkowego odpowiedzialnego za syntezę centrów Fe/S w obrębie Isu1. Stosując oczyszczone preparaty białek fuzyjnych Isu1-GST lub Yfh1-GST przeprowadziliśmy precypitację kompleksów białkowych w celu weryfikacji, czy wytypowane przez nas miejsca w obrębie Isu1, Yfh1 oraz Nfs1(Isd11) są istotne podczas formowania kompleksu. Na wstępie przeprowadzone eksperymenty wykazały, że białko

Yfh1 może tworzyć efektywnie tylko potrójny kompleks z białkami Isu1 oraz desulfurazą cysteinową Nfs1(Isd11). Ponadto pokazaliśmy, że aktywność desulfurazy cysteinowej jest hamowana przez białko Isu1, z drugiej strony jednoczesna obecność Isu1 oraz Yfh1 stymuluje tą aktywność, samo białko Yfh1 nie ma wpływu na aktywność Nfs1(Isd11). Natomiast mutacja w obrębie Isu1 zaburzająca oddziaływanie z desulfurazą cysteinową LVF/AAA uniemożliwiła także formowanie wielobiałkowego kompleksu z Yfh1 oraz stymulację aktywności Nfs1(Isd11), co sugeruje że kompleks Isu1-Nfs1(Isd11) musi się najpierw się uformować aby mogło zostać związane białko Yfh1.

Kolejne wyniki jednoznacznie pokazały, że reszty aminokwasowe motywu PVK w szczególności K136, a w mniejszym stopniu P134 i V135 w obrębie białka Isu1 oraz W131 białka Yfh1 są ważne podczas formowania kompleksu wczesnego etapu biosyntezy centrów Fe/S. Równocześnie ten sam motyw PVK w obrębie Isu1 jest kluczowy podczas oddziaływania substratu z wyspecjalizowanym Hsp70 – białkiem Ssq1. Mechanizm tych interakcji pozostaje jednak niewyjaśniony. Prawdopodobna wydaje się możliwość konkurencji pomiędzy tymi białkami o wiązanie do Isu1. W najbliższym czasie zbadamy także, czy forma w jakiej występuje białko Isu1 (holo – z centrum Fe/S, czy apo – bez centrum Fe/S) determinuje jego wyższe powinowactwo do danego białka partnerskiego.

Jednocześnie pokazaliśmy, że D86 oraz E89 w obrębie Yfh1 oraz R313, R315 i R318 w obrębie Nfs1(Isd11) uczestniczą we wzajemnym oddziaływaniu. W dalszej kolejności przeprowadzona analiza filogenetyczna pokazała, że zidentyfikowane rejony zaangażowane we wzajemne oddziaływanie w obrębie białek wczesnego kompleksu biogenezy centrów Fe/S są silnie konserwowane ewolucyjnie, co wskazuje na fakt iż molekularny mechanizm procesu biosyntezy centrów Fe/S jest także konserwowany w toku ewolucji.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Studia na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego-Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego rozpocząłem w 1996 roku. W 1999 rozpocząłem pracę magisterską w Katedrze Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego kierowanej przez Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna. Moim bezpośrednim opiekunem naukowym została dr Agata Czyż. Pod jej opieką rozpocząłem badania nad testem służącym do boindykacji substancji mutagennych występujących w środowisku morskim.

Opracowanie testu służącego do bioindykacji substancji mutagennych w środowisku morskim

Czyż, A., Szpilewska, H., **Dutkiewicz, R.**, Kowalska, W., Biniewska-Godlewska, A. & Węgrzyn G. (2002) *Mutation Research* 519: 67-74

W 1975 roku Ames i współpracownicy opracowali metodę detekcji substancji mutagennych w kompleksach i mieszaninach biologicznych (Ames i wsp., 1975). W teście Amesa do wykrywania substancji mutagennych wykorzystuje się szereg szczepów *Salmonella typhimurium* z mutacjami w genach operonu histydyny. Poziom mutagenności badanej substancji chemicznej określa się na podstawie liczby kolonii rewertantów *his⁻* do *his⁺* *S.typhimurium* wyrosłych na płytkach zawierających daną substancję, lecz nie zawierających histydyny. Stosowane w teście Amesa szczepy posiadają także inne mutacje, zwiększające poziom ich wrażliwości na wykrywane substancje mutagenne.

Test Amesa oparty na szczepach *S.typhimurium* wykorzystuje się między innymi do badania mutagennych skażeń środowiska morskiego. Ponieważ jednak bakterie *S.typhimurium* nie należą do ekosystemu morskiego nie jest możliwe wykrywanie przy ich

pomocy substancji bezpośrednio w wodzie morskiej. Stwierdzono, że morska, luminescencyjna bakteria *Vibrio harvei* może być odpowiednim bioindykatorem zanieczyszczeń mutagennych. Bakteria ta charakteryzuje się znacząco większą wrażliwością na promieniowanie UV oraz większą wrażliwością na fiolet krystaliczny niż stosowane w standardowym teście Amesa mutanty *S.typhimurium*. Bakteria *V.harvei* jest więc organizmem wrażliwym na czynniki uszkodzające DNA, jak również organizmem o wysoce przepuszczalnej otoczce komórkowej, co ułatwia wnikanie do wnętrza komórki substancji o stosunkowo dużych cząsteczkach (Czyż i wsp., 2000a; Czyż i wsp., 2000b; Czyż i wsp 2001). Mój wkład w opracowaniu testu służącego do bioindykacji substancji mutagennych występujących w środowisku morskim opartego na bakterii *V.harvei* polegał na porównaniu czułości tego testu z czułością standardowego testu Ames, wyniki tych badań potwierdziły użyteczność nowego testu i zostały opublikowane (Czyż i wsp. 2002).

Rola genu *yhbZ* bakterii *Escherichia coli*

Dutkiewicz, R., Słomińska, M., Węgrzyn, G. & Czyż A. (2002) *Current Microbiology* 45: 440-445

Zielke, R., Sikora, A., **Dutkiewicz, R.,** Węgrzyn, G. & Czyż, A. (2003) *Microbiology* 149: 1763-1770

Równolegle pod kierunkiem dr Agaty Czyż i Prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna prowadziłem badania mające na celu wyjaśnienie roli produktu genu *yhbZ* bakterii *Escherichia coli*. Gen *yhbZ* koduje białko należące do podrodziny małych monomerycznych białek wiążących GTP. Homologi genu *yhbZ* występują w wielu organizmach, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Białka wiążące GTP odgrywają kluczową rolę w regulacji podstawowych procesów w komórkach wszystkich żywych organizmów, aczkolwiek stosunkowo niewiele dotychczas wiadomo o roli białek wiążących GTP w komórkach prokariotycznych. Dlatego też podjąłem próbę konstrukcji mutantu insercyjnego w genie *yhbZ* bakterii *Escherichia coli*, wykorzystując system rekombinacyjny oparty na plazmidzie z temperaturo-wrażliwym origin replikacji pSC101. W toku doświadczeń nie udało mi się otrzymać żywotnego mutantu *E.coli* z insercją w genie *yhbZ*. Weryfikując, czy otrzymany wynik może być spowodowany przez nieprawidłowe działanie wykorzystywanego przez nas systemu rekombinacyjnego, przeprowadziłem konstrukcję mutantu insercyjnego w innym genie *E.coli* – *lacZ*, co powiodło się.

W toku dalszej pracy rolę genu *yhbZ* bakterii *E.coli* starałem się określić, badając wpływ nadekspresji tego genu w komórce. Zauważyłem, że przeżywalność po naświetlaniu różnymi dawkami UV szczepu *E.coli* z nadekspresją genu *yhbZ* była dużo wyższa w porównaniu ze szczepem bez nadekspresji tego genu.

Wstępne eksperymenty cytometrii przepływowej wykazały, że wśród komórek *E.coli* z nadekspresją genu *yhbZ* jest obecna duża frakcja o znacznie wydłużonym kształcie. Na podstawie tego faktu można było postawić hipotezę, że komórki te mają problemy z replikacją DNA lub/i z podziałami chromosomu. Tak więc przeprowadziłem doświadczenia, w których badałem syntezę DNA w komórkach z nadekspresją genu *yhbZ* poprzez pomiar ilości wcielanej radioaktywnej tymidyny. Jednakże nie zauważyłem żadnych istotnych różnic między szczepami. Również doświadczenia badające poziom transkrypcji i translacji (poprzez pomiar wcielania odpowiednio – radioaktywnej urydyny i radioaktywnych aminokwasów) nie wykazały różnic między szczepami. Nie zaobserwowałem również różnic w odpowiedzi komórek na czynniki stresowe.

Dalsze eksperymenty cytometrii przepływowej wykazały istotne różnice w rozdziale DNA między komórkami *E.coli* zdolnymi do nadekspresji genu *yhbZ*, a komórkami szczepu

kontrolnego. Różnice były szczególnie dobrze widoczne po dodaniu antybiotyków: rifampicyny (hamuje transkrypcję, co powoduje hamowanie inicjacji replikacji chromosomów) i cefaleksyny (hamuje podziały komórkowe). Po dodaniu antybiotyków szczep *E. coli* z nadekspresją genu *yhbZ* wykazywał zwiększającą się asynchroniczną inicjację replikacji w porównaniu do szczepu kontrolnego, który wykazywał cały czas synchroniczną inicjację replikacji. Wyniki tych badań stanowiły istotną część pracy magisterskiej pt.: „Rola genu *yhbZ* bakterii *Escherichia coli*”, którą przygotowałem pod kierunkiem dr Agaty Czyż oraz zostały opublikowane (Dutkiewicz i wsp., 2002). Dalsze badania z użyciem bakterii *Escherichia coli* i *Vibrio harvei* wykazały, że produkt genu *cgtA* (homolog genu *yhbZ*) zaangażowany jest w proces naprawy DNA poprzez stymulację ekspresji genu *recA* i w ten sposób aktywację kaskad naprawy DNA zależnych od RecA (Zielke i wsp., 2003). W czerwcu 2001 roku uzyskałem tytuł magistra biotechnologii.

Charakterystyka biochemiczna mitochondrialnego białka opiekuńczego Ssq1 (Hsp70)

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E., Marszałek, J. (2003) *J. Biol.Chem.* 278: 29719-29727

W tym samym roku rozpocząłem studia doktoranckie w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej Uniwersytetu Gdańskiego, w Zespole Badawczym – Biologii Mitochondriów, kierowanym przez Prof. dr hab. Jarosława Marszałka. Przedmiotem moich badań został wyspecjalizowany system mitochondrialnych białek opiekuńczych uczestniczący w syntezie centrów żelazo-siarkowych Fe/S.

Białka opiekuńcze należące do rodziny Hsp70 występują we wszystkich rodzajach komórek i uczestniczą w wielu podstawowych procesach metabolicznych takich jak: prawidłowe zwijanie łańcucha polipeptydowego syntetyzowanych białek, formowanie i dysocjacja kompleksów białkowych, transport białek przez błony komórkowe, ochrona polipeptydów przed działaniem czynników stresowych, regulowana proteoliza (Craig i wsp., 1993; Hartl, 1996; Bukau i Horwich, 1998). Często w komórce jedno białko należące do rodziny Hsp70 pełni wszystkie wymienione funkcje. W związku z tym, syntetyzowane jest w dużych ilościach oraz charakteryzuje się niską specyficznością substratową. Przykładem takiego białka występującego w mitochondriach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) jest produkt genu *SSC1* (Langer i Neupert, 1994; Martinus i wsp., 1995). Funkcje Ssc1 są istotne dla komórek i delecja genu *ssc1* jest letalna. Z drugiej strony, w mitochondriach występuje inne białko należące do rodziny Hsp70, Ssq1, którego stężenie jest 500-1000 razy niższe od stężenia Ssc1, a fenotypowe efekty delecji kodującego je genu ograniczone są do zaburzeń homeostazy żelaza i biogenezy centrów żelazo-siarkowych Fe/S (Craig i wsp., 1999; Voisine i wsp., 2000). Przykłady te ilustrują dwa trendy w ewolucji białek opiekuńczych: (1) funkcja w wielu przemianach metabolicznych, mała specyficzność substratowa i występowanie w dużych ilościach, (2) wąska specyficzność substratowa i występowanie w ograniczonej ilości. Większość wcześniejszych badań nad molekularnym mechanizmem działania białek opiekuńczych koncentrowała się na białkach o niskim stopniu specyficzności. Niewiele zaś było wiadomo o białkach wyspecjalizowanych. Pojawiło się więc pytanie jakie są czynniki warunkujące specyficzność tej grupy białek? Czy jest ona uwarunkowana poprzez selektywne oddziaływanie Hsp70-substrat, czy też wyznacznikiem specyficzności są współpracujące z Hsp70 białka pomocnicze typu J?

Obiektem moich badań podczas doktoratu były mitochondrialne białka Ssq1 (Hsp70) oraz Jac1 (białko typu J), o których na podstawie wcześniejszych badań genetycznych było wiadomo, że uczestniczą w procesach biogenezy centrów Fe/S. Jednak nie było biochemicznych dowodów, że białka Ssq1 i Jac1 współpracują ze sobą.

Po raz pierwszy z użyciem oczyszczonych białek pokazałem, że Ssq1 i Jac1 działają wspólnie, przy czym funkcja białka Jac1 polega na aktywacji wiązania natywnego substratu Isu1 do Ssq1. Białko Isu1, jak powyżej opisałem, spełnia rolę molekularnego rusztowania, w obrębie którego montowane są centra Fe/S. Pokazaliśmy także, że w przeciwieństwie do bakteryjnego odpowiednika, białka Hsc66 (Silberg i wsp., 1998; Silberg i Vickery, 2000; Silberg i wsp., 2001), mitochondrialne Ssq1 wymaga udziału czynnika uwalniającego nukleotyd – białka Mge1 w funkcjonowaniu cyklu wiązania i dysocjacji substratu białkowego Isu1 sprzężonego z aktywnością ATPazy Ssq1. Ponadto uzyskane wyniki wskazały na fakt, że dwa systemy mitochondrialnych białek opiekuńczych, Ssc1-Mdj1 oraz Ssq1-Jac1, korzystają wspólnie z białka Mge1. Wyniki tej części badań zostały przedstawione w publikacji (Dutkiewicz i wsp. 2003).

Znaczenie domeny J białka Jac1 oraz rejonu LPPVK białka Isu1 w funkcjonalnym oddziaływaniu Isu1 i Ssq1

Dutkiewicz, R., Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E., Marszalek, J. (2004) *J. Biol.Chem.* 279: 29167-29174

Badania nad bakteryjnym białkiem IscU (homolog drożdżowego białka Isu1) wykazały, że motyw pięciu aminokwasów LPPVK jest odpowiedzialny za specyficzne wiązanie IscU do bakteryjnego białka Hsc66 (homolog drożdżowego białka Ssq1) (Hoff i wsp., 2003).

Rodzina białek Isu1 jest bardzo silnie konserwowana ewolucyjnie, a rejon LPPVK jest identyczny wśród wszystkich poznanych dotychczas homologów. Aby bliżej scharakteryzować oddziaływanie drożdżowego białka substratowego Isu1 z Ssq1 i potwierdzić biologiczne znaczenie motywu LPPVK w rejonie 132-136 białka Isu1, skonstruowaliśmy mutanty w tym rejonie, tak że każdy kolejny aminokwas motywu LPPVK był zamieniony na alaninę. Został skonstruowany również mutant, który miał zamienione wszystkie trzy aminokwasy z C-końca motywu LPPVK na alaniny (PVK-AAA). Okazało się, że potrójny mutant *isu1*(PVK-AAA), jak i pojedyncze mutanty drożdżowe *isu1*(L132A) oraz *isu1*(K136A) posiadały fenotyp letalny. Natomiast mutant *isu1*(P134A) charakteryzował się wolnym wzrostem, a *isu1*(P133A) i *isu1*(V135A) rosły jak kontrola z dziką wersją genu *ISU1*.

Aby potwierdzić, czy fenotypy komórek drożdżowych posiadających zmutowaną wersję genu *isu1* mogą korelować z właściwościami biochemicznymi białek, przystąpiłem do ich oczyszczania i charakterystyki oddziaływania z białkami Jac1 i Ssq1 w obecności ATP i ADP. Otrzymane wyniki wykazały zaburzone oddziaływanie z Ssq1 mutantów białka Isu1, które posiadały zamienione ostatnie trzy aminokwasy w motywie LPPVK – Isu1(P134A), Isu1(V135A), Isu1(K136A) i Isu1(PVK-AAA) i to zarówno w obecności ADP, jak i w eksperymentach przeprowadzonych w obecności Jac1 i ATP. Natomiast wszystkie mutanty białka Isu1 oddziaływały jak dzika forma z białkiem Jac1. Także doświadczenia, w których badałem stymulację aktywności ATPazy białka Ssq1 w obecności białek Jac1 i Mge1 przez poszczególne mutanty białka Isu1 wykazały, że zamiana trzech ostatnich aminokwasów rejonu LPPVK powoduje spadek stymulacji ATPazy Ssq1, z tym że potrójny mutant Isu1(PVK-AAA) wykazuje brak stymulacji, mutanty Isu1(P134A) i Isu1(K136A) powodują niewielką stymulację, a Isu1(V135A) w dużym stężeniu powodował stymulację aktywności ATPazy Ssq1 jak dzikie białko Isu1.

Następnie staraliśmy się bliżej określić znaczenie aminokwasów w pozycji 134 i 135 białka Isu1, konstruując dodatkowe dwa mutanty *Isu1*(P134S) i *Isu1*(V135E). Okazało się, że oba mutanty drożdżowe wykazują fenotyp letalny. Ponadto oba białka oddziaływają z białkiem Jac1, ale żaden z mutantów nie wchodzi w interakcję z białkiem Ssq1. Także oba zmutowane formy białka Isu1 nie powodowały stymulacji aktywności ATPazy białka Ssq1.

W kolejnych eksperymentach wykazałem, iż nadmiar białka Jac1 może częściowo kompensować niższe powinowactwo mutantów białka Isu1 do Ssq1. Aby bliżej scharakteryzować rolę Jac1 w oddziaływaniu Ssq1:Isu1, zbadalem czy białko Jac1 z nieaktywną domeną J może stymulować wiązanie Isu1 do wiązania przez Ssq1. Mutant Jac1 miał zastąpiony wysoko konserwowany motyw HPD w domenie J na trzy alaniny. Jego fenotyp charakteryzował się wolnym wzrostem, co wskazuje że funkcjonalna domena J jest niezbędna do biologicznej aktywności białka Jac1. Okazało się, że białko Jac1(AAA) nie było w stanie ukierunkować białka Isu1 do wiązania przez Ssq1, natomiast w niewielkim stopniu powodowało stymulację ATPazy Ssq1 w obecności dzikiej formy białka Isu1, jak i mutantów Isu1(L132A) i Isu1(P133A). Z kolei w przypadku inkubacji Jac1(AAA) z mutantami Isu1 posiadającymi zmiany w trzech ostatnich aminokwasach motywu LPPVK – Isu1 (P134A), Isu1(V135A), Isu1(K136A) nie obserwowałem stymulacji ATPazy Ssq1, co podkreślało znaczenie domeny J białka Jac1 i trzech ostatnich aminokwasów rejonu LPPVK białka Isu1 w funkcjonalnym oddziaływaniu Isu1 i Ssq1. Powyższe wyniki eksperymentów zostały przedstawione w publikacji (Dutkiewicz i wsp., 2004).

Biochemiczna charakterystyka oddziaływania substratu Isu1 z mitochondrialnym białkiem Hsp70 - Ssq1

Knieszner, H., Schilke, B., **Dutkiewicz, R.**, D'Silva, P., Cheng, S., Ohlson, M., Craig, E.A., Marszalek, J. (2005) *J.Biol.Chem.* 280: 28966–28972

Miejsca mutacji w obrębie Ssq1, które osłabiają jego oddziaływanie z substratem wybraliśmy na podstawie danych dostępnych dla bakteryjnego białka DnaK. Fenyloalanina w pozycji 462 została zastąpiona seryną, a za walinę w pozycji 472 została podstawiona fenyloalanina, w wyniku czego otrzymaliśmy dwa mutanty punktowe Ssq1: odpowiednio F462S i V472F, homologiczne do mutantów DnaK F426S i V436F. Obydwa zmienione aminokwasy znajdują się w hydrofobowej kieszeni stanowiącej miejsce wiązania substratu białkowego, pełnią kluczową rolę w wiązaniu substratu i są wysoce konserwowane ewolucyjnie (Laufen i wsp., 1999; Mayer i wsp., 2000; Montgomery i wsp., 1999). Analogiczne mutacje dla DnaK u *E.coli* oraz dla Ssc1 są letalne (Mayer i wsp., 2000; Montgomery i wsp., 1999; Knieszner i wsp. 2005). Fenotyp, jaki obserwowaliśmy w przypadku szczepu drożdży niosących mutacje Ssq1 F462S był identyczny z fenotypem szczepu pozbawionego białka Ssq1. Wykazywały one podobne zahamowanie wzrostu, ponad 4-krotnie podniesiony poziom żelaza w mitochondriach oraz jedynie ok. 20% normalnej aktywności akonitazy i dehydrogenazy bursztynianowej. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi, że oddziaływanie Ssq1 z substratem jest kluczowe dla jego funkcji *in vivo* (Dutkiewicz i wsp., 2004). Zaskakujący efekt fenotypowy uzyskaliśmy dla komórek z mutacją Ssq1 V472F. Przede wszystkim ich wzrost nie odbiegał znacznie od szczepu kontrolnego bez mutacji. Obserwowaliśmy podniesiony poziom żelaza, ale jedynie 2-krotnie oraz obniżoną aktywność enzymów zawierających centra Fe/S, ale też w znacznie mniejszym stopniu niż obserwowana przy braku funkcjonalnego Ssq1. Tak więc mutacja V472F zaburza funkcjonowanie *in vivo* białka Ssq1, ale nie w takim stopniu by zdecydowanie spowolnić wzrost komórek. Ze względu na zaskakujący efekt fenotypowy mutacji V472F oczyściłem tego mutanta zbadalem jego biochemiczne właściwości. Pierwszym pytaniem, jakie sobie postawiliśmy, było czy mutant Ssq1 V472F, tak jak homologiczne mutanty białek DnaK i Ssc1, charakteryzuje się osłabionym wiązaniem substratu. Przeprowadziłem doświadczenie typu wirowanie w gradiencie glicerolu w obecności ADP. Obecność tego nukleotydu promuje konformację zamkniętą białka Hsp70, co z kolei stabilizuje kompleks

białka Hsp70 z substratem. W przeciwieństwie dla dzikiego białka Ssq1, dla mutantu Ssq1 V472F nie obserwowałem stabilnej interakcji z Isu1.

Na podstawie wirowania w gradiencie glicerolu nie można było jednak wykluczyć możliwości przejściowego oddziaływania pomiędzy Ssq1 V472F i Isu1. Dlatego, chcąc ilościowo porównać oddziaływanie dzikiego i zmutowanego Ssq1 z substratem Isu1 zastosowaliśmy technikę SPR (powierzchniowego rezonansu plazmonowego). Na powierzchni sensora został immobilizowany 10-aminokwasowy fragment sekwencji białka Isu1 zawierający motyw PVK odpowiadający za oddziaływanie pomiędzy białkiem Isu1, a Ssq1. Wiązanie zarówno dzikiego, jak i zmutowanego białka Ssq1 było znacznie silniejsze w obecności ADP niż ATP, co jest zgodne z biochemicznymi właściwościami białek Hsp70. Niemniej obserwowane w obecności ADP wiązanie Ssq1 V472F do peptydu było ok. 12 razy słabsze niż wiązanie dzikiego białka w tych samych warunkach. Pomimo 12-krotnie osłabionego oddziaływania Ssq1V472F z Isu1, mutacja ta powoduje stosunkowo łagodne efekty fenotypowe. W komórce interakcja pomiędzy tymi białkami zachodzi w obecności białka Jac1, postanowiliśmy więc zobaczyć, jaki wpływ ma Jac1 na oddziaływanie Ssq1V472F z Isu1 *in vitro*. W tym celu zbadałem aktywność ATPazową obu białek Ssq1, miareczkując je białkiem Isu1 w obecności białek Mge1 oraz Jac1. Stymulacja aktywności ATPazy Ssq1V472F była tylko około 2-krotnie niższa od obserwowanej dla dzikiego białka, co wskazuje że obecność białka Jac1 kompensuje obniżone powinowactwo Ssq1V472F do substratu. Przypuszczalnie mechanizm tej kompensacji opiera się na powstawaniu kompleksu białka Jac1 z Isu1, który ma większe powinowactwo do Ssq1V472F niż samo Isu1. W tym miejscu warto przypomnieć wyniki, jakie otrzymałem dla mutantów punktowych sekwencji PVK w obrębie białka Isu1. Białka te, pomimo znacznie obniżonego powinowactwa do Ssq1, były w stanie stymulować jego aktywność ATPazową w obecności nadmiaru białka Jac1 (Dutkiewicz i wsp., 2004). Wydaje się więc, że obecność białka Jac1 zwiększa wydajność oddziaływań, nawet w obecności mutacji zaburzających wiązanie pomiędzy Isu1, a Ssq1. Otrzymane wyniki zostały zamieszczone w publikacji (Knieszner i wsp., 2005). W 2006 roku byłem współautorem pracy przeglądowej „Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes” Lill, R., **Dutkiewicz, R.**, Elsasser, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., Muhlenhoff, U. (2006) *BBA-Mol.Cell Res.* 1763: 652-67, w której to podsumowałem między innymi stan wiedzy dotyczący funkcjonowania białek opiekuńczych podczas biogenezy centrów Fe/S.

Obrona rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Wyspecjalizowany system mitochondrialnych białek opiekuńczych uczestniczący w syntezie centrów żelazowo-siarkowych (Fe/S)” odbyła się 06.07.2005 r. Recenzentami byli Prof. dr hab. Maciej Żylicz z Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie oraz Dr hab. Marian Sęktas, Prof. UG z Uniwersytetu Gdańskiego. Praca uzyskała wyróżnienie Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego-Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Analiza strukturalno-funkcjonalna zmian w obrębie białka Jac1 podczas koewolucji układu Ssq1-Jac1

Pukszta, S., Schilke, B., **Dutkiewicz, R.**, Kominek, J., Moczulska, K., Stepien, B., Reitenga, K.G., Bujnicki, J.M., Williams, B., Craig, E.A., Marszalek, J. (2010) *EMBO Rep.* 11(5): 360-5

Kolejny aspekt, który zainteresował mnie już po zakończeniu studiów doktoranckich dotyczył koewolucji białka J, Jac1 z odpowiednim mitochondrialnym białkiem Hsp70. Przeprowadzona w naszym zespole analiza filogenetyczna wykazała, że u wspólnego przodka

Saccharomyces cerevisiae i innych spokrewnionych drożdży doszło do duplikacji genu kodującego wielofunkcyjne białko Hsp70 (Ssc1) i powstały geny paralogiczne kodujące białka Ssc1 i Ssq1. Białko Jac1 współpracuje zatem z nowym partnerem molekularnym Ssq1, przez co angażuje go w biogenezę centrów Fe/S. W przypadku białek Ssq1 i Ssc1 u *Saccharomyces cerevisiae* doszło zatem do rozdzielania funkcji (subfunkcjonalizacji), wskutek której powstało u tych organizmów wyspecjalizowane białko biorące udział w biogenezie centrów Fe/S – Ssq1, a funkcje opiekuńcze przodka pełni białko Ssc1.

Na wstępie przystępując do realizacji projektu, porównałem stymulację ATPazy obu mtHsp70 przez białko Jac1 w obecności nadmiaru białka substratowego Isu1. Okazało się że białko Ssq1 ma o wiele wyższe powinowactwo do białka Jac1 w porównaniu do białka Ssc1. Zadaliliśmy sobie pytanie z czego to wynika? Postawiliśmy dwie hipotezy robocze. Po pierwsze białko Ssq1 mogło osiągnąć wyższe powinowactwo do białka Jac1, natomiast samo białko Jac1 nie uległo zmianie, bądź oba białka koewoluowały. To skłoniło mnie do przeprowadzenia eksperymentów *in vitro*, w których zbadałem stymulację ATPazy białka Ssq1 bądź Ssc1 przez białko Jac1 z *Yarrowia lypolytica*. Wybraliśmy drożdże *Yarrowia lypolytica*, ponieważ jest to organizm, który posiada jedno mtHsp70. Okazało się, że ATPaza Ssc1 jest efektywnie stymulowana przez to białko Jac1. Ponadto analiza *in vivo* pokazała, że białka Jac1 z analizowanych organizmów są zdolne pełnić funkcję w biogenezie Fe/S. Ekspresja genu kodującego białko Jac1Y.l. kompensuje efekt delekcji genu *jac1S.c.* i wskazuje na to, że białko to efektywnie współdziała z białkiem Ssc1 w procesie biosyntezy centrów Fe/S w szczepie z delecją genu *ssq1*. Uzyskane wyniki sugerowały, że hipoteza o koewolucji obu białek jest bardziej prawdopodobna, w związku z tym przeprowadziliśmy analizę, której celem było odnalezienie różnic strukturalnych pomiędzy ortologami Jac1 współpracującymi z Ssq1 albo z Ssc1. Przeprowadzona analiza wykazała, że struktura ortologów Jac1 jest wysoko konserwowana ewolucyjnie, w przeciwieństwie do sekwencji aminokwasowej. Niemniej zidentyfikowaliśmy wyraźną różnicę strukturalną pomiędzy białkami Jac1 z organizmów zawierających Ssq1 i posiadających tylko jedno mtHsp70. Zmiany obejmują motyw helisa-pętla-helisa w obrębie domeny J. Struktura ta jest wyraźnie krótsza u białek Jac1 z organizmów gdzie istnieje białko Ssq1 w porównaniu do białek Jac1 z organizmów nie zawierających Ssq1 zarówno z królestwa grzybów, jak i innych eukariontów. Zmiana znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie konserwowanego motywu HPD. Motyw HPD jest niezbędny do stymulacji aktywności ATPazowej Hsp70 przez białka J. Jest zatem prawdopodobne, że ta delekcja jest skorelowana z przystosowaniem się białka Jac1 do nowego partnera molekularnego z rodziny Hsp70. Można było więc przypuszczać, że delekcja ta powstała w toku koewolucji białka Jac1 z jego nowym partnerem: Ssq1. Na wstępie skonstruowaliśmy mutantą chimere, który zawierał większość sekwencji *S.cerevisiae* oraz fragment pętli białka Jac1 obecnego u *Y. lypolytica*. Okazało się, że takie białko hybrydowe stymuluje aktywność ATPazy Ssc1 podobnie jak białko Jac1Y.l.. Co więcej konstrukt jest w pełni funkcjonalny *in vivo* kompensując efekt delekcji genu *jac1*, efektywnie współpracując z białkiem Ssc1 w procesie biosyntezy centrów Fe/S. Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowaliśmy, że delekcja fragmentu pętli w obrębie białka Jac1 doprowadziła do obniżenia powinowactwa Jac1 do Ssc1, natomiast powinowactwo do Ssq1 nie uległo zmianie. Ponieważ białka Ssq1-Jac1 oddziaływały efektywnie to prawdopodobnie ta zdolność stymulowała dalszą koewolucję obu białek. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w publikacji (Puksza i wsp., 2010)

Rola białka opiekuńczego Hsp40 (Mdj1) w utrzymywaniu mitochondrialnego DNA

Ciesielski, G.L., Plotka, M., Manicki, M., Schilke, B.A., **Dutkiewicz, R.**, Sahi, C., Marszalek, J., Craig, E.A. (2013) *BBA-Mol.Cell Res.* 1833(10): 2233-2243

Wierny proces replikacji i dziedziczenia mitochondrialnego DNA (mtDNA) ma kluczowe znaczenie dla oddychania komórkowego. Molekularne białka opiekuńcze są białkami zaangażowanymi między innymi w fałdowanie białek, jak i w przebudowę skomplikowanych kompleksów białkowych. Celem tej pracy było zbadanie roli drożdżowego białka Hsp40, białka Mdj1 w utrzymywaniu mtDNA. Komórki, które nie posiadają białka Mdj1 nie utrzymują funkcjonalnego mtDNA. Przeprowadzona analiza wykazała, że większość białka Mdj1 obecnego w komórce znajduje się w kompleksie z nukleoidami. Co więcej wariant Mdj1 posiadający zmiany w obrębie J domeny, która odpowiada za oddziaływanie z mtHsp70 charakteryzuje się zaburzoną stabilnością mtDNA, co pośrednio sugeruje rolę białka Hsp70 w rearanzacji mitochondrialnych nukleoidów. Z drugiej strony sama domena J białka Mdj1 nie utrzymuje mtDNA, co sugeruje że region bezpośrednio zaangażowany w oddziaływanie z mtDNA znajduje się poza domeną J. Pokazaliśmy, że białko Mdj1 wiąże się z mtDNA oraz skorelowaliśmy to oddziaływanie ze stabilnością mtDNA. Mutanty białka Mdj1, które nie wiążą się do mtDNA, jednocześnie *in vivo* nie utrzymują mitochondrialnego genomu. Nie wyklucza to możliwości oddziaływania Mdj1 z białkowymi składnikami nukleoidu, ale aktywność ta prawdopodobnie nie ma znaczenia dla utrzymywania genomu mitochondrialnego. Otrzymane wyniki badań zostały przedstawione w pracy (Ciesielski i wsp., 2013)

Wyniki badań nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego przedłożonego do oceny opublikowałem w następujących czasopismach naukowych:

1. Czyż, A., Szpilewska, H., **Dutkiewicz, R.**, Kowalska, W., Biniewska-Godlewska, A., Węgrzyn, G. (2002) „Comparison of the Ames test and newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments” *Mutat.Res.-Gen.Tox.En.* 519: 67-74
IF₂₀₀₂= 3,158 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=37
2. **Dutkiewicz, R.**, Słomińska, M., Węgrzyn, G., Czyż, A. (2002) „Overexpression of the *cgtA* (*yhbZ*, *obgE*) gene, coding for an essential GTP-binding protein, impairs the regulation of chromosomal functions in *Escherichia coli*” *Curr. Microbiol.* 45: 440-445
IF₂₀₀₂= 1,210 / pkt MNiSW₂₀₁₄=20 / Cyt. WoS=19
3. Zielke, R., Sikora, A., **Dutkiewicz, R.**, Węgrzyn, G., Czyż, A. (2003) „Involvement of the *cgtA* gene function in stimulation of DNA repair in *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi*” *Microbiology* 149: 1763-1770
IF₂₀₀₃= 3,044 / pkt MNiSW₂₀₁₄=30 / Cyt. WoS=12
4. **Dutkiewicz, R.**, Schilke, B., Knieszner, H., Walter, W., Craig, E.A., Marszalek, J. (2003) „Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis: Similarities to and differences from its bacterial counterpart” *J.Biol.Chem.* 278: 29719-29727
IF₂₀₀₃= 6,482 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=77

5. **Dutkiewicz, R.**, Schilke, B., Cheng, S., Knieszner, H., Craig, E.A., Marszalek, J. (2004) „Sequence specific interaction between mitochondrial Fe/S scaffold protein Isu1 and Hsp70 Ssq1 is essential for their *in vivo* function” *J.Biol.Chem.* 279: 29167-29174
IF₂₀₀₄= 6,355 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=53
6. Knieszner, H., Schilke, B., **Dutkiewicz, R.**, D’Silva, P., Cheng, S., Ohlson, M., Craig, E.A., Marszalek, J. (2005) „Compensation for a defective interaction of the Hsp70 Ssq1 with the mitochondrial Fe-S cluster scaffold Isu” *J.Biol.Chem.* 280: 28966–28972
IF₂₀₀₅= 5,854 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=19
7. Lill, R., **Dutkiewicz, R.**, Elsasser, H.P., Hausmann, A., Netz, D.J., Pierik, A.J., Stehling, O., Urzica, E., Muhlenhoff, U. (2006) „Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes” *BBA-Mol.Cell Res.* 1763: 652-67
IF₂₀₀₆= 6,900 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=87
8. Pukszta, S., Schilke, B., **Dutkiewicz, R.**, Kominek, J., Moczulska, K., Stepień, B., Reitenga, K.G., Bujnicki, J.M., Williams, B., Craig, E.A., Marszalek, J. (2010) „Co-evolution driven switch of J-protein specificity toward an Hsp70 partner” *EMBO Rep.* 11(5): 360-5
IF₂₀₁₀= 7,822 / pkt MNiSW₂₀₁₄=40 / Cyt. WoS=11
9. Ciesielski, G.L., Plotka, M., Manicki, M., Schilke, B.A., **Dutkiewicz, R.**, Sahi, C., Marszalek, J., Craig, E.A. (2013) „Nucleoid localization of Hsp40 Mdj1 is important for its function in maintenance of mitochondrial DNA” *BBA-Mol.Cell Res.* 1833(10): 2233-2243
IF₂₀₁₀= 5,297 / pkt MNiSW₂₀₁₄=35 / Cyt. WoS=2

Rafał Dutkiewicz
10.07.2015