



Wrocław, 28 lutego 2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Delewskiego

„Molekularny mechanizm oddziaływania domeny-J białka Jac1 z partnerskim Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych”

Centra żelazowo-siarkowe występują w wielu, istotnych dla życia komórki, białkach. Biorą one udział np. w oddychaniu, syntezie ATP, metabolizmie kwasów nukleinowych lub regulacji ekspresji genów. Biogeneza centrów żelazowo-siarkowych u organizmów eukariotycznych odbywa się w mitochondriach przy udziale białka Iru1. Następnie są one przenoszone do białek docelowych w wieloetapowym, skomplikowanym procesie w którym u drożdży *S. cerevisiae* pośredniczy wyspecjalizowane białko Hsp70 Ssq1, pomocnicze białko posiadające domenę-J (Jac1) oraz czynnik wymiany nukleotydu Mge1. Molekularne podstawy biogenezy centrów żelazowo-siarkowych są badane od wielu lat, brakuje jednak szczegółowego opisu oddziaływania białek Jac1:Ssq1. Celem pracy mgr. Wojciecha Delewskiego było szczegółowe poznanie mechanizmów oddziaływania pomiędzy białka Jac1 a Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych. Praca została zrealizowana w grupie profesora Jarosława Marszałka, posiadającego znaczący dorobek w badaniach białek opiekuńczych oraz centrów żelazowo-siarkowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa liczy 98 stron i została podzielona na rozdziały: Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Wyniki, Metody oraz Bibliografię. W liczącym 11 stron Wstępie, autor rozprawy przedstawił molekularne procesy stojące za biogenezą centrów żelazowo-siarkowych. Rozdział rozpoczyna ogólne omówienie ich roli w organizmach żywych. Następnie doktorant wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z biogenezą centrów w organizmach eukariotycznych. Autor rozprawy przedstawia trzy poznane systemy centrów, przedstawiając szczegółowo ten związany z mitochondriami. Omawia występujące w nim białka oraz wzajemne zależności pomiędzy nimi. W dalszej części wstępu, doktorant przedstawia udział białek opiekuńczych Hsp70 w transferze centrów żelazo-siarkowych do białek docelowych. Opisuje strukturalne oraz funkcjonalne aspekty aktywności tych białek, przedstawia molekularny mechanizm oddziaływania z białkami JPD oraz NEF. Następnie mgr Delewski opisuje drożdżowy system transferu centrów żelazowo-siarkowych, przedstawiając czytelnikowi białka będące przedmiotem badań opisanych w rozprawie. Wstęp kończy opisem zagadnień związanych z ewolucją mitochondrialnego systemu Hsp70. Rozdział ten jest napisany bardzo klarownie. W sposób zwięzły mgr Delewski wprowadza czytelnika w trudne zagadnienia związane z molekularnymi mechanizmami biosyntezy centrów żelazowo-siarkowych. Znakomitym uzupełnieniem dla opisanych w tekście zagadnień są, przejrzyste i systematyzujące wiedzę ryciny.

W rozdziale Metody mgr Delewski szczegółowo przedstawił stosowaną w pracy metodykę badań. Opis procedur jest napisany przejrzysto i pozwala czytelnikowi dokładnie odtworzyć opisany tok postępowania z preparatami.

Do najważniejszych wyników mgr. Delewskiego opisanych w rozprawie zaliczam:

- Wykazanie, że podstawienia alaninowe w obrębie motywu HPD domeny-J białka Jac1 oddziałującego z HSP70, mają różny wpływ na żywotność *S. cerevisiae* i *S. pombe*. W tych organizmach białkami partnerskimi dla Jac1 są odpowiednio, Ssq1 oraz mtHsp70. Doktorant używając serii plazmidów kodujących zmutowane białka, zaobserwował, że drożdże *S. cerevisiae* tolerują mutacje alaninowe w motywie HPD w warunkach optymalnych dla wzrostu, natomiast w warunkach stresu termicznego podstawienia takie są letalne.
- Określenie jak mutacje w białku Jac1 z *S. cerevisiae* i *S. pombe* wpływają na szybkość kinetyki hydrolizy ATP przez odpowiednie białko HSP70. Z użyciem znakowanego izotopowo ATP doktorant wyznaczył parametry reakcji, które wykazały różnice w powinowactwie do białek opiekuńczych. Białko Jac1_{sp} ma prawie 100x niższe powinowactwo do mtHsp70 niż Jac1_{sc} do Ssq1. Ponadto zaobserwował, że oddziaływanie Jac1_{sp}:mtHsp70 jest bardzo wrażliwe na podstawienia w motywie HPD.
- Sprawdzenie jak podstawienia w motywie HPD wpływają na tworzenie kompleksu Hsp70:Isu1 w obecności wariantów Jac1 z *S. cerevisiae* i *S. pombe*. Za pomocą rekombinowanych białek, użytych do testów *pull down*, doktorant określił, że Jac1_{sp} promuje formowanie kompleksu z mniejszą wydajnością niż Jac1_{sc}, ponadto podstawienia w motywie HPD powodują utratę zdolności Jac1_{sp} do tworzenia kompleksu mtHsp70 z Isu1-GST. Wyniki otrzymane z eksperymentów *in vivo* oraz na rekombinowanych białkach wskazały, że mechanizm wiązania Jac1 do Hsp70 jest różny dla systemów syntezy centrów żelazowo-siarkowych z *S. cerevisiae* i *S. pombe* oraz, że może to być związane z budową białek Jac w tych drożdżach.
- Przeprowadzenie analiz porównawczych sekwencji oraz rozkładu ładunków w domenach J białek Jac, które pozwoliło na wytypowanie reszt aminokwasowy potencjalnie odpowiedzialnych za oddziaływanie z białkiem Hsp70 Ssq1. W kolejnym kroku, doktorant otrzymał wielokrotnie podstawiony wariant białka, dla którego w eksperymentach *in vitro* zaobserwował spadek powinowactwa do Ssq1. Dodatkowo otrzymany przez niego wariant zawierający mutacje zmieniające ładunek oraz podstawienie w domenie HPD, był nieaktywny *in vitro* oraz letalny *in vivo*.
- Dokładne określenie zaangażowanych poszczególnych reszt białka Jac1_{sc} w oddziaływanie z Ssq1. Na podstawie modelu kompleksu Jac1_{sc}:Ssq1 doktorant otrzymał cztery warianty białka Jac1_{sc} w których specyficzne, dodatkowo naładowane aminokwasy zostały podstawione alaninami. Analiza aktywności ATPazowej Ssq1 oraz zdolności do formowania kompleksu Ssq1:Isu1 w obecności wariantów Jac1_{sc} pozwoliła na identyfikację dwóch kluczowych dla oddziaływania reszt aminokwasowych.
- Wykazanie, że mutacje dwóch kluczowych reszt odpowiadających za oddziaływanie z białkiem Ssq1 istotnie zaburzają aktywność ATPazową oraz są letalne w warunkach szoku cieplnego dla *S. cerevisiae*. Doktorant otrzymał podwójnie podstawione białko Jac1_{sc} RR/AA, dla którego przeprowadził analizę oddziaływanie z Ssq1 oraz wykonał pomiar formowania kompleksu Ssq1:Isu1 w obecności muteiny Jac1_{sc}. Ponadto, używając różnego rodzaju pożywek

wymuszających metabolizm tlenowy określił, że analizowany mutant zaburza funkcjonowanie mitochondriów oraz że drożdże, posiadające muteinę Jac1, są wrażliwe na szok cieplny.

- Przeprowadzenie analizy miejsca oddziaływania domeny ATPazowej białka Ssq1 z Jac1_{sc}. Na podstawie modelu kompleksu Jac1_{sc}:Ssq1 doktorant otrzymał cztery warianty pojedynczo oraz dwa podwójnie podstawione białka Ssq1. Następnie przeprowadził pomiary aktywności wariantów Ssq1 w obecności Jac1_{sc} oraz wiązania do Isu1. Otrzymane wyniki potwierdziły udział czterech ujemnie naładowanych reszt domeny ATPazowej Ssq1 w oddziaływaniu z Jac1_{sc}, spośród nich dwie reszty pełną kluczową rolę dla funkcjonowania Ssq1.
- Potwierdzenie miejsca oddziaływania Jac1_{sc}:Ssq1 za pomocą miejscowo-specyficznego sieciowania chemicznego. Na podstawie modeli kompleksu doktorant zaprojektował, a następnie otrzymał, sześć mutein białka Jac1, zawierających nienaturalny fotoreaktywny aminokwas, p-benzoilo-L-feniloalaninę. Następnie, po weryfikacji które z otrzymanych białek tworzą kompleks Ssq1:Isu1, przeprowadził reakcję sieciowania w obecności mutein Ssq1, potwierdzając, że oddziaływanie Jac1:Ssq1 odbywa się poprzez naładowane reszty z domeny-J Jac1 oraz z domeny ATPazowej Ssq1.

W rozdziale Dyskusja autor rozprawy bardzo trafnie podsumowuje otrzymane przez siebie wyniki. Jednocześnie przedstawia czytelnikowi szeroką analizę zależności funkcjonalnych oraz ewolucyjnych białek, biorących udział w biogenezie centrów żelazowo siarkowych.

Mam następujące pytania oraz uwagi:

Jakie są fizjologiczne stężenia białek Jac1, Isu1 oraz Ssq1 w komórkach drożdży? Jak mają się one do warunków eksperymentów *in vitro*?

Jakie były wydajności nadprodukcji białek?

Dlaczego do pomiarów stężeń nie zastosowano prostszych metod, np. pomiaru absorpcji lub metody Bradforda?

Jakie stężenia białek były używane do pomiarów denaturacyjnych, czy nie obserwowano precypitacji?

Na stronie 48 jest napisane „czterech dodatnio naładowanych reszt domeny ATPazowej Ssq1”, czy na pewno chodzi o ładunek dodatni?

Nie znalazłem odnośnika do ryciny 35, na rycinie 18 niewłaściwie oznaczono mutanty.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca prezentuje bardzo wysoki poziom, jej autora cechuje dojrzałość naukowa i głęboka analiza wyników. Doktorat jest napisany w sposób przemyślany, zwięzłe i bardzo starannie. Zamieszczone schematy ułatwiają zrozumienie przedstawionych zagadnień osobie nie zajmującej się bezpośrednio tematem rozprawy. Mając na uwadze jakość przedstawionej do recenzji rozprawy oraz opublikowanie jej wyników w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych, wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Delewskiego stosowną nagrodą.

Moja ocena przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Wojciecha Delewskiego „Molekularny mechanizm oddziaływania domeny-J białka Jac1 z partnerskim Hsp70 w procesie biogenezy centrów żelazo-siarkowych” jest wysoce pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami. Wnoszę o dopuszczenie przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego mgr. Wojciecha Delewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Daniel Krowarsch