



Dziekanat MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 2.06.2016

L.dz. nr 20/2016 *pu*

Poznań, 27.05.2016

**Recenzja**

pracy doktorskiej Mateusza Manickiego

pt. „Biochemiczna rekonstrukcja kompleksów białkowych zaangażowanych w mitochondrialną biogenezę centrów żelazo-siarkowych.”

Centra żelazo-siarkowe (centra FeS) to grupy prostetyczne o kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania, jak się obecnie szacuje, ponad 120 białek. Są to białka uczestniczące w procesach decydujących o przeżyciu zarówno komórki prokariotycznej jak i eukariotycznej, m. in. przemianach energetycznych, replikacji i naprawie DNA czy syntezie rybosomów. Zatem, biogeneza centrów FeS jest procesem o fundamentalnym znaczeniu dla funkcjonowania komórek. Co istotne, nie przebiega ona samoistnie, lecz oparta jest na funkcjonowaniu skomplikowanych kompleksów białkowych. W przypadku komórek eukariotycznych kompleksy zaangażowane w biogenezę centrów FeS są homologami odrębnych kompleksów bakteryjnych, a ich miejscem lokalizacji są mitochondria i chloroplasty. Mitochondrialny kompleks biogenezy centrów FeS składa się z ponad 20 białek, których oddziaływanie zmienia się sekwencyjnie w czasie, przy czym rdzeń tego kompleksu stanowią cztery białka. Są to: Isu1 (rusztowanie molekularne), Nfs1 i Isd11 (kompleks desulfurazy cysteinowej) oraz Yfh1 (frataksyna). Mimo wielu danych jednoznacznie wskazujących na konieczność oddziaływania między Isu1, Nfs1 i Yfh w procesie biogenezy centrów FeS, podstawy molekularne tych oddziaływań nie zostały do tej pory wyczerpująco opisane. W konsekwencji, badania prowadzone przez mgr Mateusza Manickiego, w ramach niniejszej pracy doktorskiej, mają istotne znaczenie dla wyjaśnienia działania mitochondrialnego systemu biogenezy centrów FeS, co może mieć ważne implikacje praktyczne. Należy bowiem zaznaczyć, iż dostępne dane wskazują na udział tego systemu biogenezy FeS w patomechanizmie różnych chorób człowieka, w tym nowotworów oraz chorób neurodegeneracyjnych sercowo-naczyniowych i metabolicznych.

Praca doktorska mgr Mateusza Manickiego poświęcona jest wyjaśnieniu sposobu oddziaływania białek Isu1, Nfs1(Isd11) i Yfh1, wskazaniu reszt aminokwasowych kluczowych dla tego oddziaływania i zaproponowaniu modelu działania tworzonego przez te białka systemu, znajdującego swój wyraz w przebiegu formowania centrów FeS. Zatem, mgr M. Manicki skoncentrował się na następujących zagadnieniach: (1) weryfikacji mechanizmu wiązania Yfh1 przez białka Nfs1 i Isu1; (2) wskazaniu reszt aminokwasowych uczestniczących w oddziaływaniu Yfh1 z białkami Nfs1 i Isu1, w oparciu o analizę homologicznego systemu bakteryjnego i dane literaturowe; (3) sprawdzeniu znaczenia wytypowanych reszt aminokwasowych w układach



eksperymentalnych i (4) analizie poziomu ewolucyjnego zakonserwowania wytypowanych reszt aminokwasowych. Zagadnienia te stanowią istotny i zarazem spójny wątek badań dotyczących funkcjonowania systemu biogenezy centrów FeS w mitochondriach.

Organizmem wykorzystanym w badaniach są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, powszechnie stosowany model w badaniach różnych aspektów funkcjonowania komórek eukariotycznych, w tym biogenezy centrów FeS. W przeprowadzonych eksperymentach mgr M. Manicki wykorzystał zestaw metod typowy dla badań z zakresu biologii molekularnej i biochemii, przy czym dla wyjaśnienia badanych kwestii podstawowe znaczenie miało zastosowanie syntezy i oczyszczania różnych wariantów badanych białek, precypitacji kompleksów tych białek, pomiar aktywności enzymatycznej desulfurazy cysteinowej, konstrukcja odpowiednich mutantów drożdży *S. cerevisiae* oraz analizy bioinformatyczne. Nie ulega zatem wątpliwości, że opisane wyniki mgr M. Manicki uzyskał dzięki wielu czasochłonnym i pracochłonnym eksperymentom, a ich istotność statystyczna została przez niego zweryfikowana.

Na podstawie opracowania wyników przygotowanego przez mgr M. Manickiego można sformułować następujące wnioski dotyczące wyników składających się na niniejszą rozprawę:

1. Białko Yfh1 wiąże się do uprzednio powstałego kompleksu Isu1 z Nfs1, co w konsekwencji prowadzi do stymulacji aktywności Nfs1, stanowiącej istotny etap w biogenezie centrów FeS.
2. Białka Yfh1, Nfs1 i Isu1 zachowują daleko idącą homologię z ich odpowiednikami w obrębie bakteryjnego kompleksu biogenezy centrów FeS w zakresie obecności reszt aminokwasowych istotnych dla oddziaływania Yfh1 z Nfs1 i Isu1.
3. Istotną rolę w oddziaływaniu między Yfh1 i Isu1 odgrywa tryptofan w pozycji 131 łańcucha polipeptydowego Yfh1 oraz prolina, walina i lizyna, zajmujące w łańcuchu polipeptydowym Isu1 pozycje 134, 135 i 136 czyli ewolucyjnie zakonserwowany motyw PVK.
4. Zmiany w obrębie motywu PVK nie wpływają na oddziaływanie między białkami Isu1 i Nfs1, ale mogą spowodować zmiany w regulacji aktywności enzymatycznej Nfs1.
5. Motyw PVK obecny w białku Isu1 jest miejscem wiązania białek Yfh1 i Hsp70, przy czym tworzące go aminokwasy mają różne znaczenie dla wiązania tych białek.
6. Kluczową rolę w oddziaływaniu między białkami Yfh1 i Nfs1 odgrywają reszty argininy zlokalizowane w pozycji 313, 316 i 318 łańcucha polipeptydowego Nfs1, podczas gdy skutek substytucji reszt kwasu asparaginowego i kwasu glutaminowego, odpowiednio w pozycjach 86 i 87 łańcucha polipeptydowego Yfh1, zależy od tego czy podstawione w



- tym miejscu aminokwasy obdarzone są ładunkiem, tj. obecność ładunku dodatniego w tych pozycjach całkowicie znosi oddziaływanie między tymi białkami.
7. Oddziaływanie między białkami Yfh1 i Nfs1 ma naturę elektrostatyczną, przy czym zachodzi ono niezależnie od oddziaływania między białkami Nfs1 i Isu1.
  8. Zaangażowane w oddziaływanie z białkiem Yfh1 reszty argininy białka Nfs1 nie są istotne dla jego aktywności enzymatycznej, jednak ich całkowita substytucja jest letalna dla komórek drożdży *S. cerevisiae*, co sugeruje, że powierzchnia białka Nfs1 zaangażowana w oddziaływanie z Yfh1 pełni dodatkowe funkcje istotne dla przeżycia komórki.
  9. Aminokwasy zaangażowane w oddziaływania między białkami Yfh1 i Isu1 oraz Yfh1 i Nfs1 są ewolucyjnie konserwowane u organizmów eukariotycznych i prokariotycznych. W przypadku oddziaływania Yfh1/Isu1 dotyczy to obecności tryptofanu i motywu PVK, natomiast w przypadku oddziaływania Yfh1/Nfs1 zachowany jest ładunek ujemny aminokwasów w pozycjach odpowiadających reszcie kwasu asparaginowego i glutaminowego, a także oddziałujące z nimi reszty argininy, z wyjątkiem argininy w pozycji 313, której u  $\alpha$ -proteobakterii odpowiada lizyna.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez mgr M. Manickiego jednoznacznie wyjaśniają mechanizm oddziaływania pomiędzy białkami tworzącymi rdzeń mitochondrialnego kompleksu syntezy centów FeS u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, tj. białkami Yfh1, Isu1 i Nfs1 (Ids11). Biorąc pod uwagę wysoce konserwatywny charakter analizowanych reszt aminokwasowych, można założyć, że konserwatywny charakter dotyczyć także będzie molekularnego mechanizmu oddziaływania homologów tych białek u innych organizmów. Ustalenia te stanowią istotny wkład w badania dotyczące molekularnego podłoża szlaku biogenezy centrów FeS u organizmów eukariotycznych, w tym u człowieka.

Rozprawę rozpoczyna Wstęp zwięźle wprowadzający czytelnika w podstawowe zagadnienia związane z funkcją centrów FeS, ich powstawaniem i włączaniem w białka oraz znaczeniem dla zdrowia człowieka. Recenzent chciałby podkreślić, iż mgr M. Manicki opisał te zagadnienia w bardzo wciągający sposób i to zaledwie na kilkunastu stronach. Na wysoką ocenę zasługuje również część Materiały i Metody, w której autor bardzo dokładnie opisuje wszystkie wykorzystane w pracy materiały i procedury eksperymentalne. W opinii recenzenta rozdział ten został przygotowany perfekcyjnie, ponieważ umożliwia przeprowadzenie wszystkich eksperymentów tylko w oparciu o przedstawione informacje. Dokładność to także najkrótsza charakterystyka części Wyniki i części Dyskusja. Recenzent także wysoko ocenia wykorzystanie najnowszych publikacji dla interpretacji i omówienia znaczenia uzyskanych wyników, w tym



odniesienie do funkcjonowania systemu biogenezy centrów FeS w mitochondriach człowieka. Jednak ze względów formalnych recenzent musi zaznaczyć, że mgr M. Manicki nie ustrzegł się błędów redakcyjnych, stylistycznych, deklinacyjnych i syntaktycznych oraz nieścisłości terminologicznych. Czym, na przykład, jest niekontrolowana apoptoza lub dzikie białko? Uchybienia te nie mają jednak większego znaczenia dla bardzo wysokiej oceny formalnej i merytorycznej wartości pracy przygotowanej przez mgr M. Manickiego.

Bardzo szczegółowe przedstawienie metod eksperymentalnych i wykonanych eksperymentów oraz rozbudowana dyskusja wyników sprawiają, że praca jest wysoce zrozumiała, a sformułowane przez autora wnioski logiczne i przekonujące. Recenzent byłby jednakże wdzięczny za dokładniejsze wyjaśnienie możliwych mechanizmów tylko częściowo upośledzonej przeżywalności stosowanych komórek mutantów drożdży *S. cerevisiae* z ekspresją zmienionych wariantów białka Yfh1, tj. yfh1<sup>W131A</sup> i yfh1<sup>DE/KK</sup> oraz możliwości przeżycia tych mutantów na podłożu YPG.

Wymienione powyżej zastrzeżenia i pytania nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Manickiego. Uzyskane wyniki dotyczą kluczowych aspektów funkcjonowania mitochondrialnego systemu biogenezy centrów FeS i mają bezpośrednie przełożenie na funkcjonowanie tego systemu w komórkach bakterii i w mitochondriach człowieka. Biorąc pod uwagę zwiększającą się liczbę danych wskazujących na udział badanych białek w patomechanizmie różnych chorób człowieka, uzyskane przez mgr M. Manickiego wyniki mają potencjalne znaczenia aplikacyjne.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Mateusza Manickiego zawiera cenne wyniki naukowe i stanowi wartościowy wkład w badania podłoża molekularnego procesu biogenezy centrów żelazo-siarkowych w mitochondriach. Zatem, rozprawa doktorska mgr Mateusza Manickiego odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Recenzent chciałby także podkreślić, że dorobek naukowy mgr Mateusza Manickiego uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. Na dorobek ten składają się trzy prace opublikowane w renomowanych czasopismach, tj. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* (5-IF 5,203; autor 3/8, udział równy z pierwszym autorem), *Journal of Biological Chemistry* (5-IF 4,69; autor 1/9) i *Molecular Biology and Evolution* (5-IF 11,667; autor 3/11, udział równy z pierwszym autorem). W związku z tym, recenzent wnosi o dopuszczenie mgr Mateusza Manickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Co więcej, ze względu na wysoką wartość naukową, potwierdzoną publikacją przedstawiającą wyniki



będące przedmiotem rozprawy w czasopiśmie, które na liście MNiSW uzyskało co najmniej 35 punktów (Journal of Biological Chemistry – 35 pkt), w której mgr M. Manicki jest pierwszym autorem oraz wysoką wartość merytoryczną i potencjalną aplikacyjność uzyskanych wyników, recenzent wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Manickiego.

Prof. dr hab. Hanna Kmita