



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk

Pawińskiego 5a; 02-106 Warszawa; tel: +48 22 592 21 45; fax: + 48 22 592 21 90; e-mail: secretariate@ibb.waw.pl; <http://www.ibb.waw.pl>

Warszawa, 13.01.2016

Recenzja pracy doktorskiej mgr Szymona Żwirowskiego „The mechanism of chaperone-dependent disaggregation of complexes comprising small heat shock proteins and their substrates”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Szymona Żwirowskiego została wykonana pod kierunkiem Prof. Krzysztofa Liberka w Katedrze Biologii Molekularnej i Komórkowej wydziału Międzyuczelnianego Wydział Biotechnologii UG i GUMed.

Białka opiekuńcze pełnią podstawową rolę w zapewnianiu właściwego fałdowania i przeciwdziałaniu agregacji białek w komórkach wszystkich organizmów żywych. Ich mechanizm działania jest zachowany ewolucyjnie. W przedstawionej do recenzji rozprawie Autor starał się lepiej zrozumieć funkcje białek opiekuńczych HSP70 i HSP100 w dezagregacji białek opłaszczonych małymi białkami HSP (sHSP)

Dysertacja ma klasyczną budowę i składa się ze Wstępu, rozdziałów opisujących Metody, Wyniki oraz Dyskusję. Ma 87 stron, jest obficie ilustrowana i posiada bogatą literaturę. Praca jest napisana w języku angielskim w sposób bardzo klarowny.

Wstęp doskonale wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy. Opisana jest dotychczasowa wiedza na temat funkcji i mechanizmu działania białek opiekuńczych. Dobrze zaznaczony jest dotychczasowy stan wiedzy i wynikające z niego pytania. Nie mam żadnych zastrzeżeń od tej części rozprawy.

Sekcja Materiały i Metody jest również wyczerpująca. Metody są opisane bardzo czytelnie i zrozumiale.

Wyniki opisują badania dotyczące mechanizmu dysagregacji i reaktywacji kompleksów zdenaturowanych białek z małymi białkami opiekuńczymi (sHSP) przez HSP70 i HSP100. Większość badań przeprowadzona jest na białkach opiekuńczych pochodzących z *E. coli*, ale część eksperymentów została powtórzona dla białek pochodzących z drożdży piekarniczych. Seria dobrze zaplanowanych eksperymentów *in vitro* pozwoliła stworzyć model procesu reaktywacji białek, w którym sHSP muszą oddysocjować od kompleksów dzięki pasywnemu działaniu HSP70, po czym następuje zależne od ATP i HSP100 fałdowanie białek. Głównym nowym odkryciem jest pokazanie, że HSP70 są odpowiedzialne za uwalnianie sHSP ze zagregowanych białek. Pojedynczy eksperyment przeprowadzony na komórkach sugeruje, że wyniki z badań *in vitro* mogą odzwierciedlać sytuację *in vivo*.

Na podkreślenie zasługuje niezwykle klarowność opisu i jasny ciąg logiczny przeprowadzonych eksperymentów, co świadczy o dojrzałości naukowej Autora. Wyniki zawierają jednak pewne braki, które opisałem poniżej:

- 1) W pierwszej części wyników Autor badał wielkość agregatów za pomocą dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Autor wykazał, że obecność IbpAB znacząco zmniejsza wielkość agregatów z 2000 nM do 58 nM. Niestety ze względu na dosyć lakoniczny opis, trudno jest się zorientować czy eksperymenty były wykonane w biologicznych powtórzeniach. Nie są podane odchylenia standardowe. Jest to kluczowe, ponieważ dla eksperymentów przeprowadzanych z wykorzystaniem metody DLS często trudno jest uzyskać powtarzalne wyniki. Dodatkowo wyniki są zwykle bardzo wrażliwe na stężenie badanych cząsteczek i związku z tym zazwyczaj do eksperymentów wykorzystuje się szeregi rozcieńczeń badanej próbki. Tak więc niestety bez dodatkach danych trudno jest określić wiarygodność uzyskanych wartości promienia hydrodynamicznego. Nie zmienia to faktu, że najprawdopodobniej wielkość agregatów lucyferazy jest mniejsza w obecności małych białek HSP.
- 2) Dla dużej części eksperymentów kinetycznych nie przedstawiono słupków błędów, co sugeruje, że eksperymenty nie były prowadzone w powtórzeniach, co jest istotne dla uwiarygodniania uzyskanych rezultatów.

W dyskusji Autor analizuje uzyskane wyniki na tle dotychczasowej wiedzy. Podobnie jak wcześniejsze rozdziały również ta część jest napisana w sposób bardzo klarowny i logiczny. Nie mam do niej żadnych uwag krytycznych. Sposób jej napisania świadczy o dojrzałości naukowej Autora.

W ogólnej ocenie merytorycznej pracy chciałbym podkreślić, że Autor uzyskał interesujące dane, które poszerzają naszą wiedzę o mechanizmie współdziałania sHSB z HSP70 i HSP100 w reaktywacji zdenaturowanych białek. Sposób ich przedstawiania i dyskusja wyników są godne pochwały. Jest to jedna z najlepiej napisanych prac doktorskich, jakie miałem okazję czytać. Pewien niedosyt pozostawia jednak brak wiarygodnych danych liczbowych, które mogłyby w przyszłości pozwolić na stworzenie kinetycznych modeli działania opisanego sytemu.

Podsumowując, przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską oceniam wysoko. Pomimo uwag uważam, że jest to bardzo dobra praca, pod względem uzyskanych wyników, a wyróżnia się pod względem sposobu ich prezentacji. Praca ta spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wnioskuję, zatem do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Szymona Żwirowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. Andrzej Dziembowski

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Prof. dr hab. Andrzej Dziembowski
