

Dr hab. Ewa Laskowska, prof. UG
Katedra Biochemii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk
email: ewa.laskowska@biol.ug.edu.pl

Gdańsk, 15.01.16

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Szymona Żwirowskiego
“The mechanism of chaperone-dependent disaggregation of complexes
comprising small heat shock proteins and their substrates”

Jednym z mechanizmów chroniących komórki przed stresem jest system kontroli jakości białek, do którego należą m. in. białka opiekuńcze. Ich funkcją jest zapobieganie nieodwracalnej agregacji i renaturacja nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów. W warunkach stresowych „pierwsza linię obrony” stanowią małe białka szoku termicznego (sHsps, *small heat shock proteins*), które tworzą kompleksy z uszkodzonymi polipeptydami. Przedstawicielami sHsps u bakterii *E. coli* są białka IbpA i IbpB. W porównaniu z innymi białkami opiekuńczymi z rodziny Hsp70 (DnaK) i Hsp100 (ClpB), IbpA/B nie były dotąd częstym obiektem badań. Od 1992 roku, kiedy po raz pierwszy zidentyfikowano te białka jako składniki ciał inkluzyjnych, ukazało się nie więcej niż 30 prac eksperymentalnych, które dostarczyły informacji o funkcji lub mechanizmie działania IbpA/B. Na podstawie badań prowadzonych w zespole Prof. Krzysztofa Liberka z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii wykazano m.in. że renaturacja zagregowanych białek przez bakteryjny system Hsp70-Hsp100 (DnaK/DnaJ/GrpE-ClpB) zachodzi znacznie wydajniej gdy w agregatach obecne są IbpA/B. Nie wszystkie etapy tego procesu zostały dokładnie poznane. Brakowało odpowiedzi na pytanie w jaki sposób zdenaturowane białka znajdujące się w kompleksach z IbpA/B trafiają do systemu DnaK-ClpB. Zagadnienie to stało się jednym z głównych punktów pracy doktorskiej Pana mgr. Szymona Żwirowskiego. Jej celem było poznanie struktury i organizacji kompleksów sHsps-substrat oraz szczegółowa analiza udziału białek z rodziny Hsp70 i Hsp100 w rozpuszczaniu i renaturacji tych kompleksów.

Praca została przygotowana w języku angielskim i zawiera dodatkowo streszczenie w języku polskim. Wstęp pracy (*Introduction*) bardzo dobrze przedstawia aktualny stan wiedzy

o funkcji Hsps. Szczególną uwagę Autor poświęcił strukturze, aktywności i współpracy sHsps z innymi białkami opiekuńczymi, co stanowi wyczerpujące wprowadzenie do dalszych części pracy.

Kolejne dwa rozdziały opisujące wykorzystane materiały i metody zostały przygotowane starannie i szczegółowo. W tym miejscu należy podkreślić, że białka IbpA/B są szczególnie trudnym obiektem badań *in vitro* - uzyskanie oczyszczonych preparatów IbpA i IbpB o powtarzalnych i trwałych właściwościach, takich jak aktywność i stopień oligomeryzacji, wymaga dużej wprawy i doświadczenia. Wyniki prezentowane w pracy doktorskiej świadczą o tym, że Pan mgr Żwirowski posiada te umiejętności.

Doświadczenia opisane w rozdziale *Results* zostały starannie i logicznie zaplanowane. Czytelne schematy towarzyszące wykresom i przedstawiające przebieg doświadczeń pomagają w ich zrozumieniu. Doktorant wykazał, że obecność IbpAB powodowała znaczne zmniejszenie agregatów zdenaturowanej lucyferazy, co początkowo wydawało się niezbędne dla efektywnej renaturacji tego modelowego substratu przez system Hsp70. Zaskakującym wynikiem było stwierdzenie, że IbpA/B zamiast stymulować hamowały renaturację lucyferazy w obecności niskich stężeń DnaK/DnaJ/GrpE-ClpB. Seria kolejnych doświadczeń wykazała, że: (1) IbpA/B powodowały wydłużenie początkowej fazy od momentu zmieszania kompleksów z białkami DnaK/J/E do czasu, w którym rozpoczyna się reaktywacja lucyferazy, przy czym IbpA/B nie miały w zasadzie wpływu na tempo i ostateczny poziom reaktywowanego enzymu; (2) podwyższenie stężenia DnaK i DnaJ było wystarczające aby cofnąć hamujący efekt IbpA/B. Na tej podstawie Autor wysunął wniosek, że na wstępnym etapie rozpuszczania kompleksów DnaK może pełnić specjalną funkcję niezależną od ClpB. Ponieważ rozpuszczanie i renaturacja kompleksów wymaga obu białek DnaK i ClpB jednocześnie, potwierdzenie tej hipotezy z wykorzystaniem dotychczasowego układu nie było możliwe. Pomysłowym rozwiązaniem tego problemu było zastosowanie zmutowanej formy białka Hsp104 z drożdży, która jest zdolna do samodzielnej renaturacji zagregowanych substratów i w przeciwieństwie do ClpB nie jest aktywowana przez DnaK *E. coli*. Doświadczenia te wykazały, że (1) IbpA/B utrudniają dostęp do potencjalnych miejsc wiążących Hsp104 na powierzchni agregatów; (2) zniesienie hamującego efektu IbpA/B przez białka DnaK/J/E nie wymaga ich współpracy z ClpB. Zastosowanie wirowania w gradiencie gęstości glicerolu do śledzenia losów kompleksów IbpA/B-substrat w obecności DnaK lub peptydu pochodzącego z C-końca IbpA wyjaśniło jaki może być mechanizm tego procesu. Okazało się, że oddziaływania IbpA/B-substrat na powierzchni kompleksu mają charakter dynamiczny. Dzięki temu DnaK może przyłączyć się do powierzchni agregatu w

miejscu wcześniej zajmowanym przez IbpA/B i uniemożliwić ponowne oddziaływanie IbpA/B z agregatem. Według Autora związanie DnaK jest więc wystarczające do tego aby IbpA/B oddysocjowały od kompleksu. Moim zdaniem wniosek ten wymaga jednak pewnej korekty. Do oszacowania wolnej i związanej z substratem puli białek IbpA/B zastosowano surowicę reagującą tylko z IbpA. Nie ma więc całkowitej pewności, że IbpB, podobnie jak IbpA, opuszcza kompleks po związaniu DnaK. Co prawda, dotychczasowe dane literaturowe mogą sugerować, że tak się dzieje. Doktorant również zauważa w rozdziale "*Discussion*", że możliwy jest np. taki scenariusz, według którego IbpB dysocjuje z kompleksu nawet szybciej niż IbpA. Jednak na podstawie przedstawionych w pracy wyników (*Figure 26.-29.*) należałoby sformułować bardziej ostrożny wniosek.

Kolejne doświadczenia, przeprowadzone *in vivo*, potwierdziły proponowany mechanizm. Doktorant stwierdził, że wzrost poziomu DnaK i DnaJ w komórkach *E. coli* $\Delta clpB$ $P_{IPTG}dnaKdnaJ$ powodował stopniowe usuwanie IbpA/B z agregatów endogennych białek. Czy można się spodziewać, że w miarę usuwania IbpA/B poziom DnaK w tych agregatach wzrasta? Czy istnieją jakieś dane lub wskazówki dotyczące losów IbpA/B po ich usunięciu z agregatów?

Bardzo ważnym wynikiem pracy Pana mgr. Żwirowskiego było wykazanie przy użyciu drożdżowych Hsps, że zamiana sHsps na Hsp70 w trakcie rozpuszczania i refaldowania agregatów jest procesem zachowanym w ewolucji.

W rozdziale *Discussion* Autor szczegółowo zanalizował wyniki swojej pracy porównując je z danymi literaturowymi. Zaproponował również kierunki dalszych badań, zmierzających m.in. do bardziej dokładnego wyjaśnienia przypuszczalnie różnych funkcji IbpA i IbpB w opisanym mechanizmie. Ta część pracy z pewnością potwierdza dużą wiedzę, umiejętność interpretacji wyników i naukową dojrzałość Doktoranta.

Praca Pana mgr. Żwirowskiego jest napisana w sposób klarowny, poprawnym językiem naukowym. Zauważyłam kilka drobnych błędów:

- w tytułach podrozdziałów 8.5 i 8.6 zamiast "Hsp100" powinno chyba być "Hsp104-D484K",
- na str. 56, w opisie *Figure 25.* powinno być "(a)...IbpAB-luciferase complexes were incubated at the indicated temperatures...",
- str. 29 -nazwy genów powinny być pisane kursywą.
- na niektórych wykresach nie zaznaczono wartości odchyłeń standardowych i nie umieszczono informacji o liczbie powtórzeń danego doświadczenia.

Podsumowując, uważam, że praca doktorska Pana mgr. Szymona Żwirowskiego dostarcza nowych informacji i znacząco poszerza wiedzę o działaniu białek opiekuńczych z rodziny Hsp70. Dzięki dobrze zaplanowanym doświadczeniom i odpowiedniemu warsztatowi laboratoryjnemu możliwe było wykazanie, że Hsp70 zajmuje miejsce sHsps na powierzchni dynamicznych kompleksów sHsps-substrat. Wymiana sHsps na Hsp70 umożliwia zachowanie odpowiedniej struktury substratów, a następnie ich reaktywację przez Hsp100. Stwierdzam, że osiągnięcia te spełniają wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. o stopniach i tytułach naukowych. Dorobek naukowy doktoranta uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia. W związku z tym zwracam się do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr. Szymona Żwirowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

E. Losiowski