

Prof. dr hab. Marta Pasenkiewicz-Gierula
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, lipiec, 2016.

Recenzja
pracy doktorskiej mgra Macieja Baranowskiego
pt.: „Structural analysis of substrate binding region of Hsp40 molecular chaperones”

Praca doktorska mgra Macieja Baranowskiego jest jedną z najlepszych, o ile nie najlepszą i najciekawszą ze wszystkich prac doktorskich, z jakimi miałam do czynienia w mojej dość długiej karierze naukowej. Jest to prawdziwa rozprawa, w której autor prowadzi dyskusję i rozważania bazując na własnych wynikach oraz poglądach opisanych w literaturze, a nie prezentuje otrzymanych przez siebie wyników i ich dyskusji. W zasadzie doktorant nie przedstawia własnych wyników, ale krok po kroku omawia je; po każdym kroku wyciąga wnioski, które stanowią motywację do podjęcia kolejnego kroku. Ta rozprawa jest pasjonującą i wysoce prawdopodobną historią o drodze ewolucyjnej ważnego białka opiekuńczego z rodziny Hsp40. Ilustracje w pracy są bardzo dobrze dobrane, bardzo starannie wykonane i opisane.

Proces naprawy źle zwiniętych białek jest niezwykle ważny dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Rozpoznanie nieprawidłowo zwiniętych polipeptydów należy do zadań białek z rodziny Hsp40, które wiążą je i przekazują do białek Hsp70, które z kolei często przekazują je dalej do bardziej wyspecjalizowanych białek opiekuńczych. Proces naprawy jest więc wieloetapowy i złożony i jest obiektem intensywnych badań.

Głównym zagadnieniem rozprawy jest rozpoznanie i wiązanie przez Hsp40 nieprawidłowo sfaldowanych białek. Dotychczas prowadzone badania nad tym zagadnieniem korzystały z metod strukturalnych: dyfrakcji rentgenowskiej i magnetycznego rezonansu jądrowego, oraz z metod biochemicznych: phage display i macierzy peptydowych. Badania te dostarczyły wiele cennych danych, m. in. struktur białek, ich fragmentów, kompleksów z peptydami, typów reszt aminokwasowych zaangażowanych w wiązanie substratu, jednak nie odpowiadały na zasadnicze pytanie, jak Hsp40 rozpoznają i wiążą praktycznie każde źle zwinięte białko.

Ponieważ badania eksperymentalne nie dawały odpowiedzi na pytanie zasadnicze, doktorant postanowił szukać na nie odpowiedzi stosując zupełnie inne podejście, tj. bioinformatyczne. Upraszczając sprawę, za tym wyborem stał racjonalny argument, że białka opiekuńcze Hsp40

muszą mieć przodka ewolucyjnego, a znalezienie tego przodka może sporo wyjaśnić i wskazać dalsze drogi postępowania. Wybór okazał się nad wyraz słuszny, gdyż, po głębszych analizach i rozważaniach, doktorant był w stanie wskazać „ewolucyjne” pochodzenie miejsca wiązania substratu przez Hsp40 oraz jego strukturalne i fizykochemiczne własności – kluczowe dla miejsca wiązania są dwa zagłębienia hydrofobowe i otaczające je naładowane lub polarne reszty aminokwasowe. Wątpliwości dotyczące drugiego zagłębienia doktorant sprawdzał metodą symulacji dynamiki molekularnej z rozdzielczością atomową. W pełni uwodniona C-Terminalna Domena białka Sis1 reprezentującego białka Hsp40, była symulowana przez co najmniej 40 ns. Symulacje były prowadzone dla 10 kopii układu, co umożliwiło oszacowanie statystyczne wyników. Wyniki pokazały silne fluktuacje obu zagłębień, ale nie ich zamknięcie. Obecność obu zagłębień i pozostałe własności miejsca wiązania pozwoliły na zaproponowanie długości i typów reszt aminokwasowych fragmentu łańcucha peptydowego białka związanego w tym miejscu.

Symulacje dynamiki molekularnej nieoczekiwanie pokazały dwa stabilne stany konformacyjne C-Terminalnej Domeny 1 (CTD1), z których jeden, zamknięty, jest widoczny w strukturach krystalicznych, a drugi, otwarty, nie. Doktorant przeprowadza rozważania nad udziałem wody w separacji dolnego i górnego arkusza β CTD1 (stan otwarty) oraz rolą polarnych reszt aminokwasowych na powierzchni styku obu arkuszy. Stan otwarty CTD1 ułatwia wiązanie substratu do białka.

Te rozważania są bardzo przekonujące, ale niestety, nie bazują na mocnych podstawach. Twierdzą tak na podstawie informacji zawartych w rozdziale Materiały i metody. Obliczenia metodą symulacji dynamiki molekularnej były prowadzone dla uwodnionego układu z obcięciem dalekozasięgowych oddziaływań na odległości 8 Å („...*long range interactions cut off at 8 Å*”). Taki promień obcięcia jest wyjątkowo mały. Ponieważ w białku występują reszty naładowane, właściwą metodą obliczania dalekozasięgowych oddziaływań w takim układzie jest metoda sumowania Ewalda – wskazuje na to wiele testów opisanych w literaturze. Doktorant nie wspomina o przeciwjonach, które byłyby niezbędne przy metodzie Ewalda. W opisanych obliczeniach oszacowanie oddziaływań elektrostatycznych jest prawdopodobnie niepoprawne, co podaje w wątpliwość wyniki i wyciągane na ich podstawie wnioski. Wprawdzie wnioski i scenariusz przedstawione przez doktoranta są bardzo prawdopodobne, to jednak byłyby znacznie mocniejsze, gdyby metodyka symulacji dynamiki była poprawna. Nb., jeśli układ równoważono w 250 000 krokach o długości 0.2 fs, to cała symulacja trwała 50, a nie 25 ps. Trochę dziwi mnie ten krótki krok czasowy – jeśli rozpoczęto symulacje od niskiej temperatury, to krok powinien być raczej dłuższy niż

krótszy. Poza tym, jeśli układ symulowany jest dynamiczny i w układzie zachodzą zmiany konformacyjne, to chyba właściwsze jest, by układ mógł zmieniać kształt i objętość (kontrola ciśnienia), niż by miał stałą objętość.

Pomimo dużego nakładu pracy i wielu prób, doktorantowi nie udało się przeprowadzić doświadczeń, które mogłyby potwierdzić słuszność jego rozważań. Pomimo jednak, że pierwsze kroki prowadzące do walidacji wyników otrzymanych na gruncie modelowania komputerowego nie powiodły się to zarysował się plan dalszych badań.

Drobne uwagi:

Pomimo, że praca jest spójna, pewien mój niedosyt wywołał podrozdział 6.5.1, w którym doktorant omawia otwartą konformację CTD1 białka Sis1. Ma się wrażenie, że ten podrozdział jest niedokończony. Dopiero w Dyskusji omówione jest znaczenie konformacji otwartej dla wiązania substratu i dalszego przekazywania go do białka Hsp70.

Doktorant wybrał „mało przyjazny” sposób cytowania literatury w tekście – za dużo nazwisk autorów jednej pracy, tak, że cytowania zajmują czasem 2-3 linijki, co utrudnia znalezienie dalszego ciągu tekstu.

Osie pionowe na rysunkach 26 i 27 nie są opisane – SASA jest zapewne podana w \AA^2 ? Czy jak w pozostałych przypadkach, *Running average* był z oknem 100 ps?

Nie mam podstaw, by oceniać poprawność języka angielskiego, w którym napisana jest praca – czyta się ją bardzo dobrze, a drobne pomyłki są do zignorowania.

Moje uwagi krytyczne dotyczą obliczeń metodą symulacji dynamiki molekularnej. Przeprowadzone symulacje były dopełnieniem analiz bioinformatycznych i nie były konieczną, choć ważną, częścią badań. Symulacje można powtórzyć – nie wymagają dużego nakładu środków finansowych, jedynie czasu – jeśli dadzą podobne wyniki, to wnioski wyciągnięte przez doktoranta będą mocniejsze. Pomimo tych zastrzeżeń, uważam pracę za bardzo dobrą i wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgra Macieja Baranowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego, gdyż spełnia wszystkie wymagania ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Marek Cieciura Gerula