



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
PROF. DR HAB. ARTUR OSYCZKA

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kłosowskiej pt „Mechanizm współdziałania białek Hsp70 i Hsp140 w procesie reaktywacji zagregowanych białek”

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy bardzo istotnego zagadnienia związanego z utrzymaniem homeostazy komórkowej, które w ogólnym ujęciu obejmuje zrozumienie na poziomie molekularnym systemu działania białek opiekuńczych przeciwdziałających denaturacji i agregacji białek oraz przywracających im, w procesie ponownego zwijania, prawidłową strukturę. Systemy te są ważne nie tylko w sytuacji gdy komórki funkcjonują w warunkach korzystnych dla przeprowadzania procesów życiowych, ale również w warunkach stresu prowadzących do uszkodzania natywnych struktur białkowych i do formowania agregatów białkowych. Przedmiotem pracy były dwa białka z tej grupy Hsp70 i Hsp140, w szczególności molekularny mechanizm ich oddziaływania i efektywnego współdziałania. Doktorantka postanowiła zbadać rolę białka Hsp70 na poszczególnych etapach procesu dezagregacji agregatów białkowych przez Hsp140, wykorzystując do tego szereg zaawansowanych technik biochemicznych i biologii molekularnej. Już na wstępie pragnę zaznaczyć, że rezultat tych badań to niezmiernie ważne i ciekawe z poznawczego punktu widzenia wyniki opisane w znakomitej rozprawie doktorskiej i powiązanych z nią znakomitych publikacjach naukowych, których należy pogratulować Doktorantce jak i Jej Promotorowi.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa została zredagowana w języku angielskim (zaopatrzona polskim streszczeniem) na 90 stronach maszynopisu, w klasycznym układzie obejmującym: streszczenie pracy, wstęp, cele pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, oraz spis literaturowy.

Wstęp jest przejrzystym i ciekawie napisanym wprowadzeniem o charakterze przeglądu literaturowego opisującym współczesny stan wiedzy z zakresu roli białek opiekuńczych w ogólnie pojętych procesach naprawczych ze szczególnym uwzględnieniem roli układu białek Hsp70-Hsp40. Należy zwrócić uwagę, że w rozdziale tym podkreślone są niewyjaśnione dotąd zagadnienia, które bezpośrednio nawiązują do celów pracy. Rozdział drugi to cel pracy precyzyjnie, choć w ogólnym zarysie, sformułowany w jednym zdaniu. W kolejnych rozdziałach znajdziemy opis materiałów i metod użytych w pracy. Na uwagę zasługuje fakt, że w pracy

użyto zarówno techniki biologii molekularnej jak i biochemii z elementami biofizyki (w tym spektroskopii fluorescencyjnej). Najważniejszymi rozdziałami rozprawy, stanowiącymi o jej wyjątkowej wartości poznawczej są Wyniki i Dyskusja. Wyniki podzielone są na podrozdziały zaopatrzone w bardzo informatywne tytuły znakomicie obrazujące najważniejszą ideę/rezultat przedstawiany w danym podrozdziale. Często można tu znaleźć schemat obejmujący krótkie (nawet jednozdaniowe) wprowadzenie zagadnienia, po którym pojawia się szczegółowe pytanie jakie stawia sobie Doktorantka, po czym zwięźle opisane są same wyniki przeprowadzonych eksperymentów, co z kolei prowadzi do jednoznacznych konkluzji.

Poszczególne konkluzje, zostały zebrane w koncepcyjnie logiczną całość użytą do sformułowania modelu opisującego mechanizm aktywacji białka Hsp104 przy udziale białka Hsp70 w obecności ADP, oraz sposób allosterycznej regulacji Hsp104. Modele te zostały przedstawione w rozdziale Dyskusja zaopatrzonym dwoma podsumowującymi schematami (Rys 33 i 34). W rozdziale tym znajduje się też dyskusja znaczenia uzyskanych w kontekście fizjologii komórki oraz perspektyw dalszych badań.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczyć należy:

Wykazanie, że HSP 104 jest wrażliwe na stężenie ADP i przy fizjologicznych stężeniach ADP aktywność ATPazowa oraz dezagregacja białek przez HSP104 są znacznie przyhamowane.

Wykazanie, że Hsp70 współdziałając z Hsp104 umożliwia wydajną dezagregację białek nawet przy stosunkowo wysokim stężeniu ADP.

Zidentyfikowane miejsca oddziaływania między Hsp70 i Hsp104.

Zaproponowanie modelu allosterycznej regulacji działania białka Hsp104 opartym na dwóch stanach enzymu.: i) stanie inhibowanym przez ADP ii) stanie aktywnym, który może być indukowany poprzez związanie z pomocą Hsp70 zagregowanego substratu, bądź na drodze niezależnej od Hsp70, gdy substrat ma strukturę nieuporządkowaną.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi ciekawe spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

1. Zastanawia mnie ogólna bioenergetyka reakcji zachodzących przy udziale Hsp104: Czy cała reakcja jest napędzana hydrolizą ATP (egzoergiczny proces hydrolizy ATP napędza endoergiczny proces zwijania białka podlegającego naprawie, czy też zwijanie białka jest procesem egzoergicznym wymuszającym hydrolizę ATP – pytanie to zadaję m.in. w kontekście stwierdzenia „Under such experimental conditions (excess ATP) Hsp104 is a potent ATP-hydrolyzing and protein unfolding machine” str 33.)

2. Czy w warunkach stresu zawsze jest tak, że poziom ATP się obniża a ADP podnosi (opis na stronie 33) – pytam w kontekście pracy Soini et al., z Microbial Cell Factories (2005)? Czy w różnych organizmach/komórkach/tkankach może być różnie?

3. Zastanawia mnie, czy proces inhibicji aktywności ATP-azowej białka Hsp104 przez ADP zależy (może zależeć) od czasu inkubacji białka z ADP?

4. Skąd wiadomo, że w eksperymentach opisanych na str 68,69 RCMLa podlega procesowi translokacji, czy były robione pomiary podobne do tych przedstawionych na Ryc 13?

5. Z przedstawionej dyskusji (str 76) odnoszę wrażenie, że oddziaływanie między Hsp-104 a Hsp-70 jest dość labilne/nietrwałe. Czy można by/próbowano uzyskać bardziej trwały kompleks (np. przez obniżenie siły jonowej). Czy wiadomo coś na temat stechiometrii wiązania, z iloma cząsteczkami Hsp70 oddziałuje heksamer Hsp104? Czy można rozważyć układ eksperymentalny (np. z wykorzystaniem znakowanych białek), który umożliwiłby śledzenie dynamiki oddziaływań między tymi białkami?

6. W świetle dyskusji zamieszczonej w par 8.4 – zastanawiam się, czy poziomy ekspresji Hsp70 i Hsp104 ulegają zmianie w warunkach stresu? Czy eksperymenty odnoszące się do tego zagadnienia (np. badania na poziomie mRNA) były prowadzone i są opisane w literaturze?

7. Eksperymenty opisane w par 7.3 nasuwają mi parę pytań: i) skąd wiadomo że forma Hsp104 D484K Y507A F508A jest nadaktywna (tak jak uprzednio opisana forma Hsp104 D484K)?; ii) czy badany był efekt D484K Y507A (czy mógłby on stanowić alternatywną do D484K F508A wersję minimalnej zmiany wywołującej obserwowany efekt?); iii) czy podobnego efektu jak w przypadku D484K Y507A F508A można się spodziewać po mutacjach Y507A F508A wprowadzonych do formy natywnej (tzn bez D484K); iv) skąd wiadomo, że Y507A F508A znosi oddziaływania między białkami?

Mam też parę uwag i spostrzeżeń:

1. Ze względu na charakter badań, tekst zawiera bardzo dużo skrótów, m.in. w odniesieniu do nazw białek, domen białkowych, związków chemicznych i ich pochodnych. Jednakże lista skrótów jest zbyt ograniczona i dla niespecjalisty w dziedzinie zrozumienie tekstu może być w znaczący sposób utrudnione poprzez brak wyjaśnień niektórych skrótów w tekście, lub brak naprowadzeń/bieżących wyjaśnień, które ułatwiłyby czytelnikowi ich zrozumienie. Dla przykładu: i) dużym ułatwieniem byłoby umieszczenie nazwy Hsp70 i Hsp40 w Tabeli 1 (jeśli dobrze rozumiem Hsp70 odnosi się do grupy Ssa, a Hsp40 do Ydj1, Sis1?) ii) nie jest jasne czy skrót "Msn2/4" (str 15) oznacza fizyczny kompleks białek Msn2 i Msn4, czy też odnosi się jedynie do grupy tych białek, podobna sytuacja ze skrótem „Sse1/2 na str 23; iii) nie znalazłem wyjaśnienia skrótu NTD (str 21); iv) domyślam się, że skrót MD jest jednoznaczny z M-domain, ale przydałoby się wyjaśnienie, choćby w opisie do Rys. 7.; v) objaśnienie co oznacza FRCMLa pojawia się na stronie 52 podczas gdy ten skrót jest wielokrotnie stosowany wcześniej w tekście; vi) nie znalazłem objaśnienia, co oznacza skrót RA (str 49)

2. Pomocny byłby, moim zdaniem, schemat ilustrujący ogólne procesy wprowadzone na początku wstępu (str 14, 15), mógłby on znacznie ułatwić zrozumienie tekstu.

3. Pomiar zmian w anizotropii fluorescencji był w pracy używany zarówno do detekcji procesu degradacji fRCLMa (znakowany substrat) i uwalniania krótkich, znakowanych peptydów, jak i do opisu procesu tworzenia kompleksu Hsp 104 z substratem (str 53). Wydaje się, że zasadnym byłoby opisanie, nawet w skrótowy sposób, molekularnych podstaw i założeń metody w odniesieniu do badanych układów.

4. Zastanawiam się czy liza komórek (str 43) prowadzona była w buforze z dodatkiem, czy bez dodatku inhibitorów proteinaz? Nie jest to jasne z opisu.

5. W eksperymentach opisanych na stronach 58 i 60 zastosowano dwa różne sposoby regeneracji ATP, ale nie ma wyjaśnienia dlaczego.

6. Zastanawia mnie schemat postępowania przy wprowadzaniu referencji (dotyczy to zwłaszcza części Introduction). Czy referencje umieszczane na końcach akapitów dotyczyły informacji umieszczonych w całym akapicie? Jeśli nie, to w paru miejscach brakuje mi odniesień do literatury (np. str 14 ostatni akapit; str 16 środkowy akapit rozpoczynający się od „Aggregates in all....”).

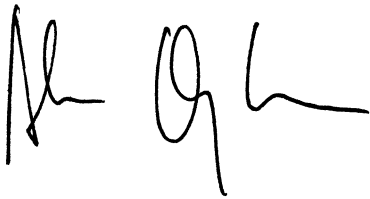
7. Od strony graficzno-językowej praca została przygotowana bardzo starannie z bardzo dobrym językiem angielskim. W tym względzie mam jedynie parę drobnych propozycji poprawy: i) str 77 użyłbym large enough difference (zamiast big); ii) str 78 czy nie powinno być "the activity of Hsp104 WT is tuned down..." str 73 czy nie powinno być „as much as by 50%” zamiast „only by 50%”

Opinia końcowa:

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, że Pani mgr Agnieszka Kłowska przedstawiła niezwykle wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie wyników cyklu precyzyjnych, przemyślanych i znakomicie przeprowadzonych prac badawczych. Wyniki te są nowatorskie i wraz z zaproponowanym modelem przyczyniają się znacząco do poszerzenia naszej fundamentalnej wiedzy na temat procesów reaktywacji zagregowanych białek w komórkach i możliwych mechanizmów protekcyjnych w warunkach stresu. Badania te nie tylko przyczyniają się do zrozumienia procesów fizjologicznych, ale także mogą dostarczyć potencjalnych możliwości terapeutycznych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Dotyczy to m.in. wykorzystania nadaktywnej formy Hsp104 przedstawionej w tej pracy, która mogłaby być pomocna w neutralizowaniu agregatów białkowych jakie powstają w tychże chorobach, o czym wspomina Doktorantka w Dyskusji.

Należy podkreślić, że wyniki będące postawą rozprawy doktorskiej zostały opublikowane na łamach artykułu w prestiżowym czasopiśmie *eLife*, gdzie Doktorantka występuje w charakterze pierwszego autora (a autorów jest tylko trzech). Ponadto Doktorantka jest współautorem w dwóch innych pracach w renomowanych czasopismach (*EMBO J* oraz *J. Biol. Chem.*).

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.13 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767) do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych w dziedzinie biochemia. Walory samej rozprawy, w szczególności wyjątkowa naukowa waga osiągniętych w jej ramach wyników i proponowanego modelu, sprawiają że rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą. Gratulując jeszcze raz Doktorantce oraz Panu Promotorowi tak cennych wyników i tak wartościowej pracy doktorskiej zwracam się z prośbą do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Agnieszki Kłosowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, consisting of three distinct, stylized parts that appear to be initials or a personal name.