



Prof. Joanna Szczepanowska  
Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego, PAN

Warszawa, 25 września 2019

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Tomasza Chamera

pt. „Hsp70 reguluje aktywność dezagregazy Hsp104 w odpowiedzi drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na stres” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Liberka oraz promotora pomocniczego Dr Agnieszki Kłosowskiej z Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Białka w komórce narażone są na liczne czynniki stresowe. Pod wpływem stresu powstają nieprawidłowo zwinięte łańcuchy polipeptydowe, które tworzą tzw. agregaty upośledzając funkcjonowanie komórki. Komórka wykształciła systemy, takie jak np. dezagregacja białek i agregatów, oraz izolacja agregatów, po to by zapobiec ich akumulacji.

W każdym z tych procesów biorą udział białka szoku cieplnego (heat shock protein, Hsp). Jest to klasa białek zachowanych w ewolucji, rozpowszechniona we wszystkich domenach świata ożywionego. Białka te tworzą sieciowo powiązany układ o wysokim stopniu złożoności. Białka Hsp mogą zatem pełnić funkcje białek opiekuńczych (molecular chaperones), które z kolei uczestniczą w nadawaniu i odzyskiwaniu natywnej struktury przez inne białka oraz ulegają konstytutywnej, niezależnej od temperatury ekspresji.

Nagromadzenie w komórce białek o nieprawidłowo sfałdowanej strukturze czy agregatów białkowych jest przyczyną wielu chorób. Spośród nich można wyróżnić choroby neurodegeneracyjne, w których wykryto zagregowane białka. Poszukiwania celów terapeutycznych w tych chorobach jest przedmiotem licznych badań. Wydaje się, że właśnie białka szoku cieplnego, odpowiedzialne szczególnie za dezagregację białek mogą być narzędziem terapeutycznym. Niezwykle ważne jest aby poznać budowę tych białek, a w szczególności miejsce ich oddziaływania i aktywacji.



Przedmiotem niniejszej pracy jest odnalezienie miejsca oddziaływania pomiędzy dwoma białkami, Hsp104, która jest dezagregazą a Hsp70, które jest białkiem wielofunkcyjnym i między innymi biorącym udział w procesie dezagregacji. Autor rozprawy doktorskiej skupił się na roli białka Hsp70 drożdżowego (Ssa1) zaangażowanego w regulację aktywności Hsp104. Próbował określić znaczenie współpracy między tymi białkami, tak aby proces dezagregacji był efektywny i wydajny. Zatem problematyka przedstawiona w rozprawie doktorskiej bardzo trafnie wpisuje się w nurt badań i znajduje głębokie uzasadnienie.

## Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska jest zawarta na 120 stronach i ma w zasadzie typowy układ dla tego rodzaju opracowań. Rozpoczyna się spisem treści, streszczeniem po polsku i angielsku, wstęp liczy 37 stron. Po krótkim i sprecyzowanym celu pracy znajduje się liczący 24 stron rozdział „Materiały i Metody”. Wyniki liczą 32 strony, po nich następuje 8 stronicowa dyskusja. Rozprawa kończy się 5 stronicowym „Załącznikiem” oraz 11 stronicowym piśmiennictwem.

## Ocena merytoryczna

**Wstęp** to podsumowanie dotychczasowej wiedzy o białka z rodziny białek opiekuńczych głównie Hsp104 i Hsp70 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Autor szczegółowo opisał rolę białek opiekuńczych w systemie kontroli jakości białek w procesach dezagregacji i fałdowania, degradacji źle sfałdowanych białek i agregatów oraz izolacji agregatów białkowych w powiązaniu z charakterystyką strukturalną tych białek. Zarówno struktura, funkcjonalne ich działanie oraz oddziaływanie między białkami opiekuńczymi jest w bardzo dostępny sposób poparte schematami. Nie mam żadnych uwag do tej części rozprawy, jest napisana w sposób wyczerpujący, absolutnie czytelny i zrozumiały. Jedyne moja sugestia jest taka, że w niektórych miejscach warto zacytować prace oryginalne, a nie tylko przeglądowe.

**Cel pracy** jest precyzyjny i bardzo jasno postawiony.

Dla realizacji zamierzeń Doktorant zastosował wiele technik badawczych opisanych w rozdziale **materiał i metody**. Zawiera on spis użytych w toku badań szczepów drożdżowych, bakteryjnych,



konstruktów/plazmidów, starterów do PCR, białek oczyszczonych z drożdży i *E.coli* oraz opis zastosowanych w toku pracy metod w tym: wyprowadzania genów do wektora i komórek *S.cerevisiae*. Opisane zostały również metody prowadzenia elektroforez (białek i DNA) i metoda Western Blot, izolacja białek i cała gama metod służących do oceny m.in. termotolerancji komórek drożdży, toksyczności białek, aktywności ATPazowej białka, reaktywacji zagregowanego GFP/lucyferazy i wiele innych. Posługiwano się także mikroskopią fluorescencyjną. Opis metod jest moim zdaniem wyczerpujący i klarowny. Jedyne moje zastrzeżenia dotyczą lakonicznego opisu metody badania kolokalizacji białek fuzyjnych, bowiem w tym wypadku została zacytowana jedynie literatura według, której przeprowadzono badanie (rozdział 5.2.7), ale jest to mało znaczące uchybienie.

Należy podkreślić, że Doktorant posługiwał się bardzo szerokim wachlarzem metodycznym, co zasługuje na szczególne uznanie.

W rozdziale „**Wyniki**” bardzo przejrzyste i logicznie przedstawiono tok badań. Tytuły podrozdziałów są sformułowane w formie wniosku, bardzo to ułatwia czytanie i zrozumienie problemu. Podobnie konstrukcja podrozdziałów opisujących rozwiązywanie poszczególnych problemów jest bardzo przejrzysta, ze wskazaniem założenia i celu danego badania.

Uważam, że opis wyników jest perfekcyjny.

**Dyskusja** jest napisana bardzo dobrze. Umiejętnie dyskutuje Autor swoje wyniki i przemyślenia w oparciu o dane literaturowe, a tytuły podrozdziałów jeszcze raz podkreślają najistotniejsze zbadane problemy.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Praca jest zredagowana w bardzo staranny sposób, napisana poprawnym językiem. W całej rozprawie nie znalazłam żadnych niezgrabnych sformułowań czy nawet literówek.

### **Podsumowanie**

Rozprawa doktorska Pana mgr Tomasza Chamera prezentuje bardzo wysoki poziom, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu i jakości badań. Ma bardzo dużą wartość poznawczą i niewątpliwie wzbogaca naszą wiedzę o znaczeniu współdziałania białek Hsp104 i Hsp70 dla efektywnej i

wydajnej dezagregacji. Wyróżnia się szeroką gamą zastosowanych metod. Część wyników badań zostało opublikowanych w renomowanym czasopiśmie z listy filadelfijskiej jakim jest Journal of Molecular Biology.

Poszczególne rozdziały są zwarte a główny cel badawczy znajduje w każdym z nich właściwe miejsce. Dobrze udokumentowane, oryginalne wyniki badań świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Autora do pracy naukowej, o umiejętności zdefiniowania problemu badawczego i jego rozwiązania, a także o znajomości rozległego piśmiennictwa w badanej dziedzinie i zdolności dyskusji własnych wyników badawczych w oparciu o dane literaturowe. Uzyskane wyniki są nowatorskie i stanowią podstawę do dalszych badań nad rolą i współdziałaniem białek z rodziny Hsp.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami. Biorąc pod uwagę powyższe, przedkładam wniosek do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana Magistra Tomasza Chamera do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania przez Niego stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii. Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej Pana Mgr. Tomasza Chamera.

Prof. Joanna Szczepanowska

