



Warszawa, 23 września 2019 r.

Dr hab. Róża Kucharczyk
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Zakład Genetyki
Ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr **Tomasza Chamery**
p.t. „**Hsp70 reguluje aktywność dezagregazy Hsp104 w odpowiedzi drożdży**
***Saccharomyces cerevisiae* na stres**”

wykonanej w na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Liberka.

Celem pracy doktorskiej mgr Tomasza Chamery było zdefiniowanie reszt aminokwasowych w dezagregazie Hsp104 kluczowych dla oddziaływania z białkiem pomocniczym Hsp70 oraz określenie roli Hsp70 w regulacji aktywności Hsp104 oraz procesu degradacji agregatów białkowych. Biorąc pod uwagę znaczenie procesu degradacji białek dla homeostazy komórki, odpowiedzi na stres i doniesienia o zaburzeniu tego procesu w chorobach neurodegeneracyjnych, zagadnienie, nad którym pracował doktorant uważam za bardzo ważne, a wyniki jego rozprawy za istotne i prowadzące do poznania mechanizmu regulacji dezagregacji białek i jego specyficzności substratowej. Wyniki te są tym istotniejsze, że mogą przysłużyć się do opracowania terapii chorób neurodegeneracyjnych, których patogenezą związana jest z agregacją białek.

Formalny opis rozprawy:

Rozprawa doktorska mgra Tomasza Chamery została napisana w języku polskim i składa się z czterech głównych rozdziałów oraz bibliografii odwołującej czytelnika do 190 artykułów. Ponadto zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, zwięźle ujęty cel pracy, spis skrótów i oznaczeń oraz osiem dodatkowych rycin dołączonych w formie załączników. Wstęp (30 stron, 15 rycin) wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy: proteostazę komórki, do utrzymania której ważna jest dezagregacja i ponowne fałdowanie

białek, charakteryzuje bardzo dokładnie białka biorące udział w tym procesie u drożdży oraz przedstawia obecny stan wiedzy na temat roli białka Hsp70.

W rozdziale Materiały i Metody (obejmującym 23 strony) Doktorant opisuje stosowane materiały, w tym oczyszczone białka użyte do eksperymentów *in vitro*, jednoznacznie wskazując, które z nich zostały oczyszczone przez inne osoby.

W pierwszej części wyników (obejmujących 32 strony) Doktorant przedstawia badania doprowadzające do identyfikacji reszty tyrozyny w pozycji 508 Hsp104 warunkującej oddziaływanie z Hsp70. Oddziaływanie pomiędzy tymi białkami Doktorant badał w eksperymentach *in vitro* z użyciem oczyszczonych z bakterii komponentów kompleksu dezagregazy (Hsp100/Hsp70 (Ssa1) / Hsp40 (Ydj1)) oraz substratów – lucyferazy i białka GFP. Eksperymenty te to oznaczenie reaktywacji zagregowanego GFP/lucyferazy jako miary aktywności dezagregazy oraz badanie fizycznego oddziaływania metodą interferometrii bio-warstwowej (BLI). Tym samym wykazał, że wariant Hsp104-F508A ma wyższą aktywność dezagregazy niż białko typu dzikiego, niestymulowaną przez dodanie Hsp70, gdyż nie wiąże się do Hsp70.

W drugiej części wyników jaką wyodrębniłam, Autor opracował teoretyczne modele aktywności heksameru dezagregazy Hsp104 w funkcji ilości podjednostek typu dzikiego i wariantu Hsp104-F508A, a następnie zbadał aktywność i wiązanie heksamerów o różnym składzie ilościowym tych wariantów białka Hsp104 do Hsp70 wykorzystując powyższe metody eksperymentalne. To doprowadziło do odkrycia, że już obecność dwóch podjednostek Hsp104-F508A w heksametrze eliminuje jego aktywność, pomimo, że substytucja Hsp104-F508A nie zaburza aktywności dezagregazy.

W trzeciej części wyników Autor zbadał skutki substytucji Hsp104-F508A *in vivo* – lokalizację białka Hsp104, jego poziom/stabilność, rekrutację do agregatów po stresie cieplnym oraz przeżywalność komórek drożdży po stresie cieplnym, po zatagowaniu wariantów typu dzikiego i z substytucją reszty fenyloalaniny w białku Hsp104 dwiema metkami – GFP i mCherry. Eksperymenty pozwoliły na konkluzję iż oddziaływanie z Hsp70 jest kluczowe dla rekrutacji Hsp104 do agregatów oraz tolerancji wysokiej temperatury.

W czwartej części wyników Autor zbadał czy region odpowiadający pozycjom Y507/Y508 u Hsp104 drożdży determinuje specyficzność gatunkową systemu Hsp104/Hsp70/Hsp40. Wprowadził charakterystyczne dla dezagregazy bakteryjnej reszty aminokwasowe w odpowiadających pozycjach do Hsp104 drożdży i na odwrót, reszty charakterystyczne dla drożdży do białka bakteryjnego. Zbadał oddziaływania takich wariantów z Hsp70 z obu gatunków w eksperymencie BLI. Eksperyment pokazał, że badany

region nie jest jedynym w białkach Hsp100 determinującym oddziaływanie z Hsp70 z tych samych organizmów.

Wreszcie w piątej części wyników Doktorant stworzył wariant Hsp104 nadaktywny, jednocześnie pozbawiony regulacji przez Hsp70 dzięki podwójnej substytucji: D484K i F508A. Zbadał oddziaływanie takiego białka Hsp104 z Hsp70 i jego aktywność dezagregacyjną. Takie białko, podobnie jak warianty z pojedynczymi substytucjami, jest eksprymowane lub akumuluje się w komórce na niższym poziomie niż białko typu dzikiego i jest dla komórek drożdży toksyczne. Tutaj rozumiem, że nie zbadane zostało, na jakim poziomie ta regulacja ma miejsce: transkrypcji czy translacji a może stabilności/degradacji tych wariantów? W eleganckich eksperymentach badania aktywności reaktywowanych białek GFP i lucyferazy jako miary oddziaływania Hsp104 typu dzikiego i z substytucjami D484K i F508A z Hsp70 w warunkach dodania częściowo rozfałdowanych substratów (kazeiny lub RCMLa) pokazał, że oddziaływanie z Hsp70 kieruje dezagregację do agregatów odciągając ją tym samym od częściowo rozfałdowanych substratów.

Dyskusja (obejmująca 8 stron rozprawy) odnosi się do głównych odkryć Doktoranta i umieszcza je w aktualnym modelu dezagregacji agregatów białkowych przez Hsp100/Hsp70/Hsp40.

Najważniejsze osiągnięcia pracy badawczej Doktoranta to:

- identyfikacja reszty fenyloalaniny w pozycji 508 białka Hsp104 bezpośrednio zaangażowanej w oddziaływanie z Hsp70,
- adaptacja metody interferometrii bio-warstwowej do monitorowania oddziaływania pomiędzy białkami Hsp104 i Hsp70 w czasie rzeczywistym,
- wykazanie, że oddziaływanie Hsp104-Hsp70 jest kluczowe dla rekrutacji Hsp104 do agregatów i tolerancji stresu cieplnego przez komórki drożdży,
- wykazanie, że oddziaływanie Hsp104 z Hsp70 kieruje dezagregację do agregatów białkowych, zmniejszając jej powinowactwo do częściowo sfałdowanych substratów.

Po wnikliwym zapoznaniu się z wynikami eksperymentów w pełni zgadzam się z wnioskami przedstawionymi przez Doktoranta w podsumowaniu Streszczenia jego rozprawy doktorskiej.

Do części metodycznej mam następujące pytania:

- 1) Rozdział 5.2.4 – w jaki sposób weryfikował Pan poprawną integrację metek GFP i Cherry do genu Hsp104? Czy sekwencjonował Pan cały genom, czy amplifikował fragment genomu

z obszaru terminatora genu *Hsp104* i sekwencjonował produkt PCR? W rozdziale 5.1.1, zamieszczone zostały startery do sekwencjonowania genu *HSP104*, każdy do sekwencji kodującej, zatem to nie jest jasne.

Do rozdziału Wyniki mam następujące pytania/uwagi:

1) Na rycinie 18A znajduje się bardzo ciekawy wynik, mianowicie forma *Hsp104* Y507A, F508A nie potrzebuje ATP do uzyskania struktury heksametru. Czy znane są mutanty substytucyjne inne, które mają taką charakterystykę? Czy ma Pan hipotezę dlaczego ta forma białka nie wymaga ATP do heksameryzacji, zwłaszcza, że pokazano na białku bakteryjnym iż heksameryzacja wymaga ATP? Z Pana analiz wiadomo, że ta forma białka wydajnie hydrolizuje ATP, a zatem musi je wiązać. Jaki jest efekt *in vivo* w komórkach drożdży posiadających tylko ten wariant *Hsp104*? Czy to zagadnienie warto dalej badać Pana zdaniem mając w ręku taki ciekawy wariant białka *Hsp104*?

2) Opisując próby zbadania oddziaływania *Hsp104* z *Hsp70* z zastosowaniem sieciowania brak informacji czy podejścia te były w eksperymentach *in vivo* czy *in vitro*?

3) Na rycinie 26B wyraźnie widać lokalizację jądrową *Hsp104*-GFP, opisaną w literaturze o czym Autor nie wspomina. Natomiast znacznik mCherry zaburza lokalizację *Hsp104* w ten sposób, że jądro jest słabo widoczne a dyfuzja w cytoplazmie ma charakter skupiskowy (Ryc. 27B). Zaburzenie lokalizacji skoordynowane jest z zaburzeniem stabilności *Hsp104*-mCherry (Ryc. 27A). Autor powinien skomentować ten fakt w Dyskusji. Pomimo tej dysfunkcji *Hsp104*-mCherry białko to jest jednak rekrutowane do agregatów wydajnie w warunkach stresu termicznego, toteż pokazana ko-lokalizacja *Hsp104* z agregatami lucyferazy na Ryc. 27 jest oczywiście przekonująca.

4) Twierdzi Pan, że pojedyncze warianty *Hsp104*-F508A i D484K nie wykazują tak negatywnego wpływu na wzrost komórek drożdży jak wystąpienie ich razem. Myślę jednak, że różnice pomiędzy *Hsp104*-D484K a *Hsp104*-F508A,D484K są minimalne. Czy może zbadał Pan wzrost w pożywce płynnej – być może różnice we wzroście byłyby wyraźniej widoczne. W tej formie wynik nie jest przekonujący. Dodatkowo, choć obniżenie ekspresji wariantów *Hsp104* nie ulega wątpliwości, czy ten wynik zanalizowano statystycznie (Ryc. 32A)?

W Dyskusji wyników w rozdziale 7.2 tłumaczy Pan brak termotolerancji w komórkach drożdży posiadających *Hsp104*-F508A skutkiem nagromadzenia się agregatów białkowych, co jest wysoce prawdopodobne. Czy jest możliwe, że dodatkowo na ten fenotyp wpływa powinowactwo *Hsp104*-F508A, które wymyka się kontroli *Hsp70*, do częściowo

sfałdowanych białek? Co prawda eksperymentów takich *in vivo* Pan nie wykonał ale co Pan uważa na ten temat? Czy można to zagadnienie zbadać *in vivo*?

W rozprawie Autor nie ustrzegł się skrótów myślowych (np.: rozdział 6.1. ostatni akapit), licznych literówek i błędów edytorskich/językowych, np. używanie nazwy aminokwasu zamiast reszty aminokwasu czy pomyłki w numeracji Rycin czy ich cytacji w tekście. Nie obniżają one wartości naukowej badań niemniej ich liczba jest znaczna, ma wpływ na lekturę rozprawy dlatego z obowiązku niektóre wymienię:

1) Dwa zamieszczone złoża Sephadex G25 i SP-Sepharose Fast Flow nie były wspomniane w żadnym z protokołów.

2) W rozdziale 5.2.3. brak informacji co było matrycowym DNA.

3) Rozdział 5.2.13.5 odsyła do rozdziału 5.2.12.1., którego brak w rozprawie; podobnie w rozdziale 5.2.16. Autor odsyła do rozdziału 5.2.14. zamiast 5.2.15.

4) W rozdziale 5.1.4. – plazmidy pFA6a-GFP(S65T)-His3MX6 oraz pFA6a-link-mCherry-SpHIS5 nie są plazmidami drożdżowymi, utrzymują się jedynie w komórkach bakteryjnych; warto podać z kolei przy plazmidach drożdżowych ich charakter centromeryczny czy wielokopijny.

5) W rozdziale 5.2.20. – chodziło zapewne o bufor renaturacyjny GFP, który jest na liście buforów, nie ma natomiast buforu denaturacyjnego GFP.

6) Brak kilku referencji na liście referencji na końcu pracy, np.: rozdział 3.1. Sontag i WSP., 2017, rozdział 3.3.3. – Kampinga i Craig, 2006, rozdział 3.4.1. – Acebron i wsp., 2007 (lub chodziło o pracę z 2008 r.?), podobnie Acebron i WSP., 2009 zacytowana w rozdziale 3.4.2., zacytowanej w rozdziale 5.2.18. Norby 1998, Sanchez i Lindquist, 1990 zacytowanej w rozdziale 6.5.3. Są też takowe na liście, które nie były cytowane w tekście: Bhattacharaya i wsp. 2009, Burki F 2014, Fan CY 2004, Li C 2011, Mayer MP 2015.

7) Zachowanie tych samych kolorów wykresów wiązania Hsp104 w eksperymencie BLI na wszystkich Rycinach bardzo ułatwiłoby porównanie wyników czytelnikowi.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska przedstawia nowe odkrycia badawcze. Uważam, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań zostały przez Doktoranta właściwie uzasadnione a ponadto większość wyników otrzymanych przez Doktoranta zostało opublikowanych w bardzo dobrym czasopiśmie naukowych o

międzynarodowym zasięgu – *Journal of Molecular Biology*. Przedstawione przeze mnie komentarze oraz uwagi dotyczące rozprawy mgr Tomasza Chamery w większości mają charakter drugorzędny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. Dlatego też, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Tomasza Chamery w pełni spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UW i GUMed o dopuszczenie pana mgr Tomasza Chamery do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Róża Kucharczyk

