

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Mileny Stolarskiej

pod tytułem

„Zastosowanie metod filogenetycznych do badania pochodzenia, funkcji oraz oddziaływań pomiędzy białkami systemów opiekuńczych Hsp70/JDP”

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Promotora Pana Prof. dra hab. Jarosława Marszałka oraz Promotora pomocniczego Pana dra inż. Bartłomieja Tomiczka w Zakładzie Biochemii Ewolucyjnej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Badania opisane w pracy zostały sfinansowane przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, w ramach programu TEAM nr POIR.04.04.00-00-4114/17-00 oraz z grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2021/41/B/NZ8/02835.

Obiektem analiz opisanych w recenzowanej rozprawie są białka wchodzące w skład systemów opiekuńczych Hsp70/JDP, tj. białka opiekuńcze Hsp70 oraz białka pomocnicze posiadające domenę J (JDP). Systemy Hsp70/JDP biorą udział w procesach takich jak fałdowanie nowo syntetyzowanych polipeptydów, usuwanie agregatów białkowych, transport białek przez błony, jak również w procesie syntezy centrów żelazowo-siarkowych. W komórkach współwystępuje i współdziała ze sobą wiele rodzajów białek Hsp70 oraz JDP różniących się lokalizacją komórkową, specyficznością substratową i mających różne funkcje. Historia ewolucyjna tych rodzin białek nie jest jednak dobrze poznana. Doktorantka wykorzystała szereg metod filogenetycznych do zbadania powiązań ewolucyjnych pomiędzy licznymi przedstawicielami (ortologami i paralogami) obu typów białek obecnymi w proteomach eukariontów, bakterii oraz archeonów. Przeprowadziła także analizę wzorców konserwacji, poszczególnych pozycji tych białek. Takie podejście doprowadziło do uzyskania bardzo interesujących z punktu widzenia biologii ewolucyjnej i biochemii wyników. Dotyczą one zagadnień takich jak nabywanie przez białka nowych funkcji, różnicowanie zmian w powinowactwie do białek partnerskich, jak również zmian zachodzących podczas koewolucji współpracujących ze sobą partnerów białkowych. Wyniki te pozwoliły także wnioskować o mechanizmie oddziaływania białek

Hsp70 i JDP ze sobą oraz ze swoimi substratami. Warto tu dodać, że przedstawione badania, pogłębiając wiedzę o systemach Hsp70/JDP mogą mieć także zastosowanie w medycynie, gdyż zaburzenia proteostazy są związane z etiologią schorzeń takich jak cukrzyca, czy też choroby neurodegeneracyjne.

Podsumowując, tematyka recenzowanej pracy jest w mojej opinii ważna, interesująca, a przedstawione w pracy analizy wypełniają lukę w wiedzy dotyczącej ewolucji rodzin białkowych Hsp70 i JDP.

Ocena formalna

Rozprawę doktorską Pani mgr Mileny Stolarskiej stanowią trzy rozdziały, z których każdy odnosi się do odrębnego zagadnienia związanego z ewolucją białek systemów Hsp70/JDP. Poszczególne rozdziały zawierają wprowadzenie teoretyczne, opis metodologii, opis wyników oraz dyskusję. Rozdziały te poprzedza wspólny wstęp, streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy zamieszczono wspólną bibliografię. W mojej opinii taki, nieco nietypowy układ pracy poprawia jej czytelność i ułatwia zrozumienie treści.

Rozprawa jest napisana poprawnym językiem, chociaż zdarzają się w niej drobne błędy składniowe. Bardzo wysoko oceniam zamieszczone w rozprawie ryciny i ich opisy. Za bardzo dobry pomysł uważam także przygotowanie przez Doktorantkę dodatkowych schematycznych kladogramów z zaznaczonymi miejscami, na których czytelnik powinien zwrócić szczególną uwagę. Znacznie ułatwiły one zrozumienie treści rozprawy. Niewielkie zastrzeżenia mam jedynie do edycji samego tekstu – niekonsekwentnego formatowania odnośników do literatury oraz braku wyjustowania tekstu. Nie umniejszają one wartości recenzowanej pracy.

Ocena merytoryczna

Głównym celem ocenianej pracy było zastosowanie analizy filogenetycznej do zbadania zależności ewolucyjnych w rodzinie białek JDP oraz poznanie pochodzenia i różnicowania funkcjonalnego dwóch systemów JDP/Hsp70 różniących się stopniem specjalizacji. Cel pracy jest zgodny z tematem rozprawy. Jest on także odpowiedni dla pracy doktorskiej, jego realizacja prowadzi bowiem do poszerzenia dotychczasowej wiedzy i przyczynia się do rozwiązania oryginalnego problemu naukowego. Badania przeprowadzone w ramach doktoratu przedstawiony cel w pełni realizują.

Wstęp pracy skupia się na opisie budowy, funkcji oraz mechanizmu działania systemów opiekuńczych Hsp70/JDP. Wstępy poprzedzające poszczególne rozdziały zawierają natomiast bardziej szczegółowe informacje dotyczące analizowanych w nich rodzin białek, jak również uzasadnienie podjęcia opisanych badań. W mojej opinii część teoretyczna stanowi dobre wprowadzenie w tematykę ewolucji systemów opiekuńczych Hsp70/JDP. Zabrakło mi w niej jednak przeglądu, nawet bardzo pobieżnego, istniejących metod filogenetycznych mogących służyć do rozwiązywania postawionych pytań badawczych, jak również uzasadnienia, dlaczego dana metoda została wybrana przez Doktorantkę.

Opis metod zamieszczony w poszczególnych rozdziałach jest wyczerpujący i klarowny. Doktorantka postarała się także o krótkie objaśnienie zasady działania używanych programów oraz znaczenia zastosowanych parametrów, czy też modeli. W wielu przypadkach bardzo ułatwiło to zrozumienie logiki przeprowadzonych analiz oraz interpretację uzyskanych wyników. Zastosowane metody filogenetyczne są w mojej opinii odpowiednie dla rozwiązywanych problemów. Jedynym moim zastrzeżeniem do tej części rozprawy jest pominięcie informacji o wersjach wykorzystanych baz danych oraz programów. Odtworzenie uzyskanych wyników w celu ich weryfikacji lub rozszerzenia może być bardzo utrudnione bez tej wiedzy.

W dalszej części recenzji omówię wyniki zamieszczone w rozprawie, z podziałem na poszczególne rozdziały.

W rozdziale *Ewolucja eukariotycznych JDP spokrewnionych z bakteryjnym DnaJ* Doktorantka badała historię ewolucyjną dwóch klas białek JDP – A i B, różniących się mechanizmem oddziaływania z białkami Hsp70 i pełniących odmienne funkcje. Doktorantka przeszukała proteomy organizmów ze wszystkich domen życia, z wykorzystaniem profili HMM zoptymalizowanych w rozpoznawaniu przedstawicieli obu badanych klas białek JDP. Dla zidentyfikowanych homologów zrekonstruowała i zwalidowała drzewo filogenetyczne. Na jego podstawie wykazała, że klasa B białek JDP nie stanowi grupy monofiletycznej. Za inny ważny wynik tej części rozprawy uważam odtworzenie sekwencji zmian reszt aminokwasowych, prowadzących do odmiennych mechanizmów aktywacji domeny J u obu klas.

Rozdział *Ewolucja systemów JDP/Hsp70 wyspecjalizowanych w biogenezie centrów FeS* zawiera opis odtworzenia filogenezy białek Hsp70 zaangażowanych w biogenezę centrów żelazowo-siarkowych. Doktorantka wykazała w nim, że występujące u bakterii białko opiekuńcze HscA, którego wyłącznym substratem jest białko rusztowania IscU, nie ma bliskich homologów w komórkach

eukariotycznych. Jego funkcję przejęły białka oddziałujące z szeroką gamą substratów i bliżej spokrewnione z bakteryjnym DnaK. Doktorantka potwierdziła także, że specjalizacja do syntezy centrów FeS białek Hsp70 występujących w mitochondriach niektórych grup grzybów, powstała podczas ewolucji wtórnie.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym *Ewolucja miejsca oddziaływania domeny-J JDP z partnerskim Hsp70*, Doktorantka prześledziła zmiany zachodzące w pozycjach odpowiadających za wzajemne oddziaływanie białek Hsp70 i JDP. Analizy takie zostały przedstawione bliskich ortologów białek z dwóch systemów – bakteryjnego DnaK/DnaJ oraz drożdżowego Ssq1/Hsc20. Wyniki tych analiz wskazują, że miejsca oddziaływania nie są silnie zakonserwowane. Doktorantka wykazała, że jest to rezultatem wzajemnej koewolucji obu partnerów, jak również plastyczności ich wzajemnych oddziaływań.

Podsumowując, zawartość merytoryczna przedstawionej rozprawy oceniam bardzo wysoko. Co warto podkreślić, część analiz opisanych w pracy weszła w skład dwóch artykułów opublikowanych w wysoko punktowanych czasopismach naukowych:

Tomiczek, B., Delewski, W., Nierzwicki, L., **Stolarska, M.**, Grochowina, I., Schilke, B., Dutkiewicz, R., Uzarska, M. A., Ciesielski, S. J., Czub, J., Craig, E. A., & Marszałek, J. (2020). Two-step mechanism of J-domain action in driving Hsp70 function. *PLoS computational biology*, 16(6), e1007913.

Kleczewska, M., Grabinska, A., Jelen, M., **Stolarska, M.**, Schilke, B., Marszałek, J., Craig, E. A., & Dutkiewicz, R. (2020). Biochemical Convergence of Mitochondrial Hsp70 System Specialized in Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3326

Pani mgr Milena Stolarska nie jest wprawdzie pierwszym ani korespondencyjnym autorem tych publikacji, ale jest to spowodowane interdyscyplinarnym charakterem obu prac oraz na dużą liczbą opisanych w nich eksperymentów, a nie niskim wkładem Doktorantki.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań, które chciałabym zadać Doktorantce podczas rozprawy. 1) Na czym polega i jak przebiegał w badaniach opisanych w rozprawie proces optymalizacji parametrów („trenowania”) profili HMM? Czy przestrzeń parametrów jest przeszukiwana w sposób losowy, czy stosuje się tu jakiś algorytm zapewniający zbieżność do najlepszego wyniku? 2) Według uzyskanego przez Doktorantkę drzewa filogenetycznego rodziny białek JDP, białka występujące w cytoplazmie eukariontów są bliżej spokrewnione z białkami

bakteryjnymi niż białkami archeonów. Doktorantka zaznaczyła w dyskusji, że ten wynik nie jest zbyt pewny. Zakładając jednak, że ta część filogenezy została odtworzona poprawnie, jakie mogłoby być wytłumaczenie takiej topologii drzewa? 3) W ostatniej części pracy Doktorantka wykazała, że podczas ewolucji zmieniają nie tylko aminokwasy za odpowiedzialne za oddziaływanie pomiędzy białkami HSP70 i JDP, ale też pozycje ważne dla tego oddziaływania. Metody filogenetyczne traktują zazwyczaj każdą z pozycji zestawionych sekwencji niezależnie i wzorce obejmujące kilka miejsc mogą zostać przez nie niewykryte. Czy jest dziś możliwa analiza konserwacji, czy też koewolucji, z wykorzystaniem dodatkowych informacji o strukturze białka?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Mileny Stolarskiej spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r. poz. 478. Doktorantka potrafi samodzielnie rozwiązać problemy naukowe poprzez odpowiednio zaplanowane i przeprowadzone badania, zdobyła też szeroką wiedzę dotyczącą białek opiekuńczych, mechanizmów ewolucji oraz metod filogenetycznych. Przedstawiona praca doktorska istotnie poszerza dotychczasową wiedzę dotyczącą ewolucji systemów opiekuńczych Hsp70/JDP. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Mileny Stolarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 23.10.2023

dr hab. Katarzyna Tomala