

Dr hab. Agata Starosta, prof. IBB PAB
Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa
agata.starosta@ibb.waw.pl
tel. 22 592 3341

Warszawa, 01.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Huberta Wyszkwoskiego

Rozprawa doktorska zatytułowana „Role of J-domain proteins in regulation of Hsp70-mediated protein disaggregation” została przygotowana przez Pana Huberta Wyszkwoskiego pod opieką promotorską prof. dr hab. Krzysztofa Liberka i dr Agnieszko Kłosowskiej. Praca została przedłożona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego.

Głównym celem pracy badawczej przedstawionej w niniejszej dysertacji jest poznanie roli białek z domeną J w regulacji dezagregacji agregatów białkowych przez system Hsp70, używając pomiarów biochemicznych w czasie rzeczywistym i wykorzystując model drożdżowy. Wyniki przedstawione w pracy są nowe, częściowo już opublikowane i stanowią uzupełnienie badań dotychczas publikowanych przez grupę profesora Liberka.

Praca doktorska mgra Huberta Wyszkwoskiego została napisana w języku angielskim. Treść pracy jest zgodna z tematem wskazanym w tytule. Układ treści jest właściwy i prawidłowy dla danego formatu. Praca jest standardowo podzielona na kilka głównych rozdziałów: *Streszczenie, Wstęp, Cele Pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja*. Autor wykorzystał obszerną bibliografię odwołującą się do 139 artykułów naukowych. Autor stosuje w pracy odpowiedni dla tego formatu język i terminologię. Spis treści przygotowany jest prawidłowo. W pracy brakuje listy rycin. Praca jest przejrzysta, rzeczowa oraz starannie przygotowana. Tekst opatrzony jest 31 rycinami. Ryciny są starannie przygotowane, opisy na nich umieszczone są czytelne. Bibliografia została odpowiednio użyta w tekście i we właściwy sposób użyta do dyskusji wyników.

Pierwszy rozdział, *Wstęp*, autor rozpoczyna zwięzłym opisem mechanizmu agregacji białek, roli białek opiekuńczych w procesie przeciwdziałania nieprawidłowemu fałdowaniu białek, a następnie opisuje białko opiekuńcze Hsp70, czynniki wymiany nukleotydów, dezagregazę Hsp104. W drugiej części wstępu autor przybliżył informacje dotyczące białek z domeną J, w tym ich podział na klasy.

Następnie, autor przedstawia szczegółowy *Cel badawczy*, którego zadaniem jest ocena różnic funkcjonalnych w aktywności układu Hsp70 podyktowanej przez białka klasy A i B z domeną J w dezagregacji białek wykorzystując na obserwację w czasie rzeczywistym interakcji białek opiekuńczych z agregatem białkowym.

W rozdziale *Materiały*, autor podaje listy szczepów bakteryjnych i drożdżowych, plazmidów, białek, odczynników, przeciwciał, pożywek do hodowli mikroorganizmów, antybiotyków, starterów DNA do mutagenety wykorzystanych w badaniach.

W rozdziale *Metody*, autor opisuje protokoły, z których korzystał w celu realizacji zadań badawczych. Opisane są procedury oczyszczania poszczególnych białek (Sis1 i warianty, Ydj1, Ssa1 i warianty, Hsc70, DNAJA2, DNAJB4, Hsp105), pomiarów biochemicznych, w tym test ponownego łądowania lucyferazy, test reaktywacji GFP, oraz warianty pomiarów interferometrii biowarstwowej wykorzystanych w pracy doktorskiej.

Sekcję *Wyniki* autor rozpoczyna opisem eksperymentu w którym porównuje potencjał znanych z literatury systemu Hsp70-Hsp100 kompleksów białek Ssa1, Hsp104 z Ydj1 (klasa A) lub Sis1 (klasa B) do przywrócenia aktywności zagregowanych białek reporterowych: Lucyferazy i GFP. Dezagregacja w obecności Ydj1 rozpoczyna się szybciej, ale jest mniej efektywna niż w obecności Sis1. Następnie autor wykorzystuje interferometrię biowarstwową do porównania potencjału wiązania białek Sis1 lub Ydj1 wespół z białkiem Ssa1 do zagregowanego substratu. Autor obserwuje większy ładunek białka Sis1 na substracie (niezależnie od jego pochodzenia). Wiązanie białek do substratu jest zależne od aktywnego białka Ssa1 mającego zdolność hydrolizy ATP, co potwierdzono testując mutant Ssa1. Autor testował zdolność interakcji Ydj1 i Sis1 z substratem przy nieobecności partnerów białkowych wykazując, że Ydj1 ma większe zdolności do oddziaływania z zagregowanym białkiem niż Sis1. Sekwencyjne dodawanie białek do zagregowanego substratu, poprzedzone inkubacją substratu z Ydj1 lub Sis1 pokazało, że preinkubacja z Ydj1 promuje wiązanie Ssa1 do kompleksu, natomiast preinkubacja z Sis1 nie wpływa na wiązanie Ssa1. Podsumowując, Interakcje białek Ydj1 i Sis1 z białkiem Hsp70 wykazuje odmienną kinetykę. Ydj1 wiąże się szybciej do agregatów białka niż Sis1, ale Sis1 promuje wiązanie większej liczby Hsp70.

W kolejnym kroku autor testuje jak liczba cząsteczek Ssa1 w kompleksie wpływa na łądowanie białka Hsp104. Zaobserwowano zwiększoną liczbę cząstek Hsp104 związanych do kompleksu Sis1/Ssa1, w zgodzie z obserwacją, że w danym układzie w kompleksie znajduje się więcej cząstek Hsp70.

Następnie autor pokazuje, że Sis1, ale nie Ydj1 wiąże się do Ssa1 bez obecności zagregowanego białka. W kolejnym kroku autor rozszerza pomiary o preinkubację zagregowanego substratu z Ydj1/Ssa1 lub Sis1/Ssa1, a następnie ponowne dodanie tych kompleksów do reakcji. Obserwuje zmienioną kinetykę wiązania Sis1/Ssa1, ale nie dla Ydj1/Ssa1, do preinkubowanego substratu, co sugeruje wpływ modyfikacji substratu na wiązanie kompleksu dezagregującego. Obserwację tą weryfikuje przy użyciu substratu sieciowanego glutaraldehydem potwierdzając wpływ modyfikacji zagregowanego substratu na cały proces dezagregacji przy udziale Sis1, ale nie Ydj1. Następnie, autor pokazuje, że modyfikacja substratu, preinkubacja z Sis1/Ssa1 lub Ydj1/Ssa1, wpływa na zwiększenie aktywności dezagregazy. Autor zaprezentował wirowanie w gradiencie glicerolu do oceny działania Sis1/Ssa1 pokazując modyfikację zagregowanego substratu. W ostatnim kroku tej części *Wyników*, autor pokazuje, że domena CTDI białka Sis1 oraz motyw EEVD białka Ssa1 są kluczowe dla aktywności remodelowania zagregowanych substratów białkowych.

W ostatniej części *Wyników*, autor opisuje wyniki analogicznych jak dla powyżej opisanych eksperymentów przeprowadzonych na ludzkich odpowiednikach białek kompleksu dezagregującego: Hsc70, DNAJA2

(klasa A, odpowiednik Ydj1), DNAJA2 (klasa B, odpowiednik Sis1), Hsp105 obserwując podobne trendy ja dla białek drożdżowych.

W *Dyskusji* autor rozważa rolę białek z domeną-J jako głównego czynnika determinującego proces dezagregacji. Autor opisuje mechanizm działania białek oraz dyskutuje wyniki w kontekście opisanych w literaturze badań *in vivo*. Autor kończy *Dyskusję* rozważaniami na temat funkcji ludzkich homologów białek drożdżowych.

Podsumowując, autorowi pracy udało się opisać różnice w mechanizmie działania białek z domeną-J klasy A i B w systemie Hsp70 w procesie dezagregacji białek.

Komentarz merytoryczny:

- Autor mógł uwzględnić kody np. UniProt lub NCBI przy opisie białek w *Materiałach*, brakuje sekwencji starterów DNA dla konstruktów niepublikowanych wcześniej. W tekście pojawiają się białka Hsp104 i Hsp105. Brakuje opisu białka Hsp104 w *Materiałach* i *Metodach*.
- Schematy białek z uwzględnieniem mutacji, motywów (np. Sis1 CTDI, Ssa1-EEVD) testowanych w niniejszej pracy oraz z opisem na podstawie literatury mógł być uwzględniony we *Wstępie*.
- Brakuje zdjęć żeli poliakrylamidowych przedstawiających oczyszczone białka.
- Czy jakość oczyszczonych białek była analizowana i doczyszczana za pomocą filtracji żelowej? Czy oczyszczone białka były jednorodne? Jakość / jednorodność białka będzie determinować frakcję aktywną. Czy istnieje ewentualność, że preparaty oczyszczonych białek mogą zawierać aktywne białka, które się oczyściły wspólnie z testowanym białkiem?
- W jaki sposób autor przygotowywał zagregowane substraty? Czy jednorazowo dla wszystkich eksperymentów czy przygotowano substrat wielokrotnie? Czy autor prowadził kontrolę jakości / powtarzalności tego procesu? Na przykład mierząc stabilność termodynamiczną białka (np. thermal shift assay)? Na jakim etapie agregacji białka zbierano je jako substrat?

Mimo uwag, niniejszą pracę oceniam *pozytywnie*. Autor prawidłowo planuje eksperymenty i wyciąga wnioski. Wyniki stanowią kontynuację zagadnień badanych w laboratorium promotora. Część wyników jest już opublikowana w bardzo dobrym czasopiśmie i można się spodziewać kolejnej publikacji.

Stwierdzam, że praca doktorska Pana mgra Huberta Wyszkwoskiego spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.).

Zwracam się do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgra Huberta Wyszkwoskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Dr hab. Agata Starosta

