



prof. dr hab. Mikołaj Olejniczak

Pracownia Biochemii RNA

14 września 2023, Poznań

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Piotra Karasia**

**zatytułowanej**

**„Molekularne podstawy ewolucji małych białek szoku cieplnego w *Erwiniaceae*”**

Praca doktorska Pana mgr Piotra Karasia została wykonana pod opieką Pana prof. dr hab. Krzysztofa Liberka w Zakładzie Biochemii Białek Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Temat rozprawy doktorskiej jest związany z ważnym nurtem badań laboratorium promotora pracy, jakim są właściwości białek opiekuńczych z grupy małych białek szoku cieplnego.

Tematem pracy jest wyjaśnienie w jaki sposób białko opiekuńcze IbpA z bakterii rodziny *Erwiniaceae* zostało zoptymalizowane w ewolucji aby móc samodzielnie pełnić rolę, która w innych bakteriach z rzędu *Enterobacteriales* jest pełniona przez dwa białka: IbpA oraz IbpB. U bakterii, w których oba te białka są obecne IbpA funkcjonuje jako sekwestraza, czyli białko łączące się z substratami białkowymi aby zapobiec ich denaturacji w warunkach stresu termicznego, natomiast IbpB, w heterodimerycznym kompleksie z IbpA, ułatwia uwalnianie IbpA z kompleksów z substratem, czyli dezagregację we współdziałaniu z systemem Hsp70. Przeciwna sytuacja występuje u *Erwiniaceae*, gdzie białko IbpA samodzielnie realizuje obie funkcje. U innych  $\gamma$ -proteobakterii niż *Enterobacteriales* również występuje pojedyncze białko IbpA, jednak jest to sytuacja pierwotna, natomiast u *Erwiniaceae* jest to sytuacja wtórna wynikająca z utraty IbpB.

W celu wyjaśnienia w jaki sposób białko IbpA z *Erwiniaceae* zostało zoptymalizowane aby spełniać zarówno funkcję sekwestrazy jak i dezagregazy Pan mgr Piotr Karas podjął próbę rekonstrukcji, w oparciu o analizę filogenetyczną, sekwencji białka IbpA w ostatnim wspólnym przodku *Enterobacteriales*, który posiadał jeszcze oba białka, IbpA i IbpB, oraz w ostatnim wspólnym przodku *Erwiniaceae*, który był już zdolny do funkcjonowania wyłącznie w oparciu o IbpA, po utracie IbpB.



Zrekonstruowane sekwencje białkowe posłużyły Doktorantowi do syntezy odpowiadających im genów *de novo* a następnie do nadprodukcji i oczyszczenia tych białek. W odniesieniu do tej części wyników pracy chciałbym poprosić Doktoranta o przedyskutowanie w czasie obrony jakie jego zdaniem mogłoby być uzasadnienie ewolucyjne dlaczego u *Enterobacterales* innych niż *Erwiniaceae* konieczne jest występowanie obu białek? Czy świadczy to o mniejszych wymaganiach *Erwiniaceae* co do efektywnej ochrony białek przed denaturacją? Czy system dwubiałkowy jest bardziej efektywny niż jednobiałkowy? Drugie pytanie dotyczy prośby o wyjaśnienie w czasie obrony sposobu działania oprogramowania pozwalającego na rekonstrukcję sekwencji białek ancestralnych. Jakie są zalety i ograniczenia tej metody, jakie eksperymenty kontrolne należy wykonać, aby upewnić się co do prawidłowości otrzymanych wyników?

W następnym etapie pracy Pan mgr Piotr Karaś porównał właściwości obu białek zrekonstruowanych, AncA0 i AncA1, z właściwościami współczesnych białek IbpA i IbpB z dwubiałkowego systemu z *E. coli* oraz IbpA z wtórnie jednobiałkowego systemu u *E. amylovora*. W badaniach tych zastosował system eksperymentalny mierzący poziom reaktywacji lucyferazy po jej uprzedniej agregacji indukowanej podwyższoną temperaturą w obecności badanych białek opiekuńczych. Badania te pokazały, że AncA1 jest mniej wydajne w reaktywacji niż współczesne IbpA z *E. amylovora* lub heterodimer IbpA/B z *E. coli*, natomiast jest bardziej wydajne niż AncA0. Porównanie aktywności tych białek było także wsparte analizami wiązania do zagregowanego substratu za pomocą metody interferometrii biowarstwowej oraz za pomocą metody DLS. Co do tej części pracy chciałbym zapytać w jaki sposób zdaniem Doktoranta można potwierdzić, że bardzo niska efektywność AncA0 w reaktywacji (Ryc. 13, str. 59) jest prawidłową cechą zrekonstruowanego białka ancestralnego, a nie jedynie efektem uzyskania białka niefunkcjonalnego? Chodzi mi o to, że zwykle sekwencję białka czy innego biopolimeru dość łatwo jest „popsuć” przez mutacje i dlatego wyniki negatywne są trudniejsze w interpretacji.

Porównanie sekwencji obu zrekonstruowanych białek ancestralnych, AncA0 z ostatniego wspólnego przodka posiadającego oba białka, i AncA1 z ostatniego wspólnego przodka z utraconym IbpB wykazało istnienie 10 różnic w sekwencji aminokwasowej pomiędzy nimi. Aby sprawdzić, w jaki sposób te zmiany w sekwencji wpływają na różnice funkcjonalne pomiędzy tymi białkami Doktorant skonstruował mutanty białka AncA0 zawierające odpowiednie substytucje w siedmiu z tych dziesięciu



pozycji, które są najsilniej zakonserwowane we współczesnych białkach IbpA z *Erwiniaceae*. Wprowadzenie wszystkich siedmiu substytucji zgodnych z AncA1 nadawało zmutowanemu AncA0 efektywność reaktywacji lucyferazy podobną do AncA1. Dalsze badania oparte o mutagenezę AncA0 wykazały, że z tych siedmiu substytucji kluczowe dla podwyższonej aktywności są reszty aminokwasowe w dwóch pozycjach, histydyna w pozycji 66 i asparaginian w pozycji 109. Analiza struktury badanych białek i ich mutantów za pomocą programu AlphaFold pokazała, że mutacje te znajdują się w regionie domeny  $\alpha$ -krystaliny uczestniczącym w wiązaniu regionu C-końcowego tego białka. Dodatkowe badania eksperymentalne wykazały, że substytucje te powodują obniżenie zdolności do oligomeryzacji oraz do wiązania substratów przez zmutowane białko AncA0. Eksperymenty te sugerują, że przyczyną wydajniejszego działania AncA1 jako dezagregazy jest słabsze wiązanie substratów na skutek odpowiednich mutacji w pozycjach 66 i 109 domeny  $\alpha$ -krystaliny tego białka. Uderzającą obserwacją jest fakt, że we współczesnym białku IbpA z systemu dwubiałkowego *E. coli* reszty aminokwasowe w pozycjach 66 i 109 są takie jak w białku ancestralnym AncA0, a w białku IbpA z *E. amylovora* takie jak w AncA1.

Warto podkreślić, że całość pracy napisana jest niezwykle klarownie i logicznie, z pomocnymi rysunkami, co w połączeniu z bardzo ciekawym tematem sprawia, że pracę czyta się z ogromną przyjemnością. Wstęp literaturowy bardzo dobrze nakreśla ideę prowadzącą do sformułowania celu pracy oraz aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie. Dział dyskusji natomiast bardzo jasno przedstawia wyniki pracy w kontekście mechanizmu działania małych białek opiekuńczych.

Podsumowując, w ramach swoich prac badawczych Doktorant przeprowadził fascynujący intelektualnie eksperyment polegający na rekonstrukcji białek ancestralnych wobec IbpA z *E. amylovora* po to aby zidentyfikować elementy struktury tego białka niezbędne dla jego optymalnego funkcjonowania jako samodzielne białko opiekuńcze. Analiza ewolucji sekwencji białka w połączeniu z eksperymentami badającymi aktywność białek zrekonstruowanych oraz siłę wiązania przez nie substratów pozwoliła na uzyskanie niezwykle interesujących wniosków dotyczących struktury i mechanizmu działania białek IbpA na poziomie molekularnym.



Warto podkreślić, że Doktorant jest współautorem dwóch publikacji bezpośrednio dotyczących tematyki pracy doktorskiej. W pracy eksperymentalnej w bardzo wysoko cenionym czasopiśmie *eLife* jest pierwszym autorem, a ponadto w pracy przeglądowej nt. małych białek szoku cieplnego opublikowanej w *Frontiers in Biomolecular Sciences* jest drugim współautorem. Wymagające prace badawcze przeprowadzone przez Doktoranta oraz przygotowane z jego udziałem publikacje świadczą o dużej samodzielności naukowej i bardzo dobrym przygotowaniu do dalszych etapów rozwoju naukowego.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki 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. w związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr. Piotra Karasia do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie naukowej biotechnologia.

Ponadto ze względu na wysoką wartość naukową wyników badań, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Szczególnie ważnym osiągnięciem Pana mgr. Piotra Karasia, które jest uzasadnieniem wniosku o wyróżnienie, jest niezwykle interesująca intelektualnie koncepcja zastosowania predykcji sekwencji białek ancestralnych do wskazania kluczowych elementów struktury determinujących mechanizm molekularny działania współczesnych małych białek szoku cieplnego. Dzięki zastosowaniu metod analizy filogenetycznej oraz eksperymentów biochemicznych i biofizycznych Pan mgr. Piotr Karas wyjaśnił w jaki sposób białko IbpA u *Erwiniaceae* może efektywnie funkcjonować pomimo utraty genu białka IbpB, czyli w sposób odmienny niż ma to miejsce u pozostałych *Enterobacteriales*. Odkrycie to jest bardzo ważne dla zrozumienia funkcji oraz mechanizmu działania bakteryjnych małych białek szoku cieplnego.

  
Mikołaj Olejniczak